

Université de Montréal

Hépatocytes matures dérivés de cellules souches *in vitro* :
Améliorer la différenciation des cellules souches
pluripotentes induites humaines en copiant l'organogénèse
hépatique

Par M'CALLUM Marie-Agnès

Programme de Sciences biomédicales
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M. Sc)
En Sciences Biomédicales
Option Médecine Expérimentale

Avril, 2018

© M'CALLUM Marie-Agnès, 2018

Résumé :

Contexte : Il y a une grande variation de potentiel de différenciation parmi les populations de cellules souches pluripotentes induites humaines (hiPSCs). Il a été démontré que la qualité des hépatocytes dérivés des iPSCs dépend de la qualité de l'endoderme définitif (ED). Ce qui cause une telle variation & détermine la susceptibilité d'une population à se différencier vers l'endoderme est jusqu'à présent méconnu.

But : Définir le rôle de l'état de pluripotence dans la détermination du potentiel de différenciation des iPSCs vers l'endoderme

Méthodes : Trois populations d'hiPSCs, ont démontré avoir un bon (P01), un intermédiaire (P02), et un mauvais (P03) potentiel à se différencier en hépatocytes. Ces 3 populations ont été rigoureusement étudiées d'un point de vue pluripotence et comparées au cours de la différenciation en ED pendant 5 jours.

Résultats : L'expression des marqueurs de pluripotence était comparable aux cellules souches embryonnaires pour les 3 populations, avec P03 ayant démontré une plus faible expression de *NANOG*, marqueur de pluripotence. Pendant la différenciation, les facteurs de transcription impliqués dans l'induction du ED ont été exprimés plus tardivement pour P03 que pour P01 ou P02, avec une plus faible expression de *SOX17* et *CXCR4* au jour 5. La population P03 semble être plus « naïve » comparativement aux populations P01 et P02 : Les cellules P03 ont une prolifération 3 fois plus élevée, ainsi qu'une hypométhylation globale de l'ADN (29,2% pour LINE-1 pour P03 vs. 62,9% et 66,6% pour P02 et P01, respectivement), une plus faible expression de *OTX2* (associé au statut de pluripotence « amorcé ») et une plus forte expression de *YAP1* (marqueur de pluripotence « naïve »).

Conclusion : Un statut de pluripotence plus « naïf » a été corrélé avec une expression retardée de facteurs de transcription menant à l'ED, ce qui cause une différenciation incomplète et donc une plus faible maturation des hépatocytes. À l'inverse, les populations « amorcées » sont capables de se différencier plus efficacement en ED, et donc en hépatocytes. Ceci suggère qu'adapter le protocole de différenciation en tenant compte du statut de pluripotence pourrait permettre la génération d'ED de haute qualité (ainsi que tous les dérivés). Ceci pourrait en effet avoir avec une répercussion

importante pour l'utilisation des iPSCs dérivées de patients pour la médecine régénérative.

Mots clés : cellules souches, différenciation, potentiel, pluripotence, hépatocytes, endoderme.

Abstract:

Background: There is a high variation in terms of differentiation potential among human induced pluripotent stem cells (iPSCs) populations. It has been shown that the quality of iPSC-derived hepatocytes depends on the quality of the iPSC-derived endoderm (DE). What causes such variability and what determines a population's susceptibility to DE differentiation is currently unknown.

Aim: Defining the role of the pluripotency state to determine the potential of iPSCs' to differentiate to DE.

Methods: Three previously-characterized human iPSC populations having shown a good (P01), intermediate (P02) and bad (P03) potential to differentiate into hepatocytes were thoroughly assessed for their pluripotency and compared upon 5-days differentiation to DE.

Results: The expression of pluripotency markers was comparable to embryonic stem cells for the 3 populations, with P03 showing lower *NANOG* expression, a pluripotency marker. Upon differentiation, transcription factors involved in DE induction were expressed later in P03 than in P01 or P02, with lower *SOX17* and *CXCR4* expression at day 5. Also, P03 showed a doubling level that was 3-times greater, global DNA hypomethylation as well as lower *OTX2* and *YAP1* expressions. *OTX2* (associated with “primed” state) and *YAP1* (marker of more “naïve” populations) expression levels were good, easy-to-measure predictors of the state of pluripotency. The P02 population was an intermediate between P01 and P03.

Conclusions: A more naïve state of pluripotency was correlated with delayed expression of transcription factors leading to DE differentiation, with consequent incomplete differentiation and lower maturation of the resulting hepatocytes. On the contrary, more “primed” populations differentiated more effectively to DE and, consequently, to hepatocytes. This suggests that adapting the differentiation protocol to account for the state of pluripotency might allow generating high-quality DE (and all derived somatic cells) from “difficult” IPSC populations, with important repercussion for the future use of patient-derived iPSCs for regenerative medicine.

Keywords: stem cells, differentiation, pluripotency, potential, hepatocytes, endoderm

Table des matières

Résumé :	iii
Abstract:	v
Table des matières	vi
Liste des tableaux :	viii
Liste des figures - Introduction :	ix
Liste des figures – Matériel & Méthodes :	xi
Liste des figures – Résultats :	xi
Liste des sigles:	xiii
Liste des abréviations :	xiv
Remerciements :	xvi
CHAPITRE I : INTRODUCTION.....	1
1.1 Avant-Propos :	1
1.2 La modélisation des maladies du foie : cellules candidates et approches disponibles	3
1.2.1 Cellules Candidates.....	3
1.2.1.1 Hépatocytes Primaires	3
1.2.1.2 Lignées dérivées de tumeurs hépatiques	4
1.2.1.3 HepG2	4
1.2.1.4 HepaRG	4
1.2.1.5 Hépatocytes dérivés de cellules souches	5
1.2.1.6 Cellules souches mésenchymateuses.....	5
1.2.1.7 Cellules souches pluripotentes	5
1.2.1.7.1.1 Les cellules souches embryonnaires	6
1.2.1.7.1.2 Les cellules souches pluripotentes induites	6
1.2.2 Les différentes approches de culture	8
1.2.2.1 Culture en 2D	8
1.2.2.2 Culture en 3D	9
1.2.2.3 Culture tissulaire	10
1.3 Hépatocytes dérivés de cellules souches pluripotentes induites	12
1.3.1 Des cellules somatiques aux cellules pluripotentes	12
1.3.2 Mimer l'organogenèse du foie pour générer des hépatocytes à partir des iPSCs	15
1.3.2.1 Premières spécifications cellulaires :	15
1.3.2.2 Ligne primitive & Endoderme Définitif :	18
1.3.2.3 Endoderme Hépatique :	19
1.3.2.4 Hépatoblastes	21
1.3.2.5 Hépatocytes :	23
1.3.3 Caractérisation des hépatocytes dérivés des iPSCs.....	24

1.4 Les différences entre les populations d'iPSCs et leurs impacts sur le potentiel de différenciation	25
1.4.1 États de pluripotence : pluripotence naïve versus pluripotence amorcée.....	25
1.4.2 Variations parmi les populations d'iPSCs	27
1.4.3 Conséquences d'une variabilité inter-populationnelle chez les iPSCs	29
1.4.4 Mimer le rôle de l'embryogenèse : l'importance de l'endoderme	29
1.4.5 Principales voies de signalisation impliquées dans la différenciation de l'endoderme....	30
1.4.6 Problématiques et questions liées aux disparités au sein des populations d'iPSCs	33
1.5 Hypothèses & Objectifs	34
CHAPITRE II : MATÉRIEL & MÉTHODES	35
Lignées d'iPSCs.....	35
Reprogrammation.....	35
<i>Plasmides utilisés. Les 3 plasmides utilisés pour reprogrammer les cellules somatiques sont : cMyc, Klf4 et le polycistronique Klf4-Oct3/4-Sox2. Ces facteurs sont connus pour jouer un rôle clé dans l'induction de la pluripotence : Sox2 et Oct3/4 permettent le maintien de la pluripotence. Klf4 et cMyc sont connus pour permettre le maintien du phénotype des ESCs, ainsi que de permettre leur rapide prolifération. Ces plasmides induisent la surexpression de facteurs de pluripotence clés, afin de permettre la reprogrammation des cellules somatiques adultes.</i>	
	35
Culture cellulaire.	39
Différenciation.....	40
Mesure de la prolifération	44
Extraction d'ARN	45
Mesure de la production d'albumine.....	50
Mesure de la synthèse d'urée.....	51
CHAPITRE III : RÉSULTATS.....	52
CHAPITRE IV : DISCUSSION & CONCLUSION.....	73
4.1 DISCUSSION	73
4.1.1 État de pluripotence & Potentiel de différenciation.....	73
4.1.2 État de pluripotence & Potentiel de différenciation.....	73
4.2 PERSPECTIVES & DIRECTIONS FUTURES	76
4.2.1 Directions.....	76
4.2.2 Perspectives futures.....	77
4.3 CONCLUSION.....	79
Références:	80

Liste des tableaux :

Tableau	Page
1 Différences entre la culture cellulaire en 2-dimensions et en 3-dimensions (11
2 Caractéristiques de la pluripotence naïve et amorcée	24

Liste des figures - Introduction :

Figure		Page
1	Récapitulatif des différentes sources disponibles pour modéliser les maladies du foie	7
2	Phénomène de reprogrammation : d'une cellule somatique adulte à une cellule souche pluripotente induite (iPSC) capable de se différencier dans les 3 feuilles embryonnaires	11
3	Les étapes du processus de reprogrammation	12
4	Différenciation du trophoctoderme et de la masse cellulaire interne	14
5	Ségrégation entre l'épiblaste et l'hypoblaste	16
6	Importance de la proximité du mésoderme cardiaque et du septum transversum pour l'induction hépatique	18
7	Formation du bourgeon hépatique suite à l'influence des facteurs FGF & BMP4.	20
8	Différenciation des hépatoblastes suite à l'influence de l'OSM & du dexaméthasone	21
9	Changement du paysage épigénétique entre pluripotence naïve et amorcée.	24
10	Impact des petites molécules & facteurs de croissance sur la différenciation en endoderme	28
11	Principales voies de signalisation impliquée dans l'induction de l'endoderme.	29

Liste des figures – Matériel & Méthodes :

Figure		Page
1	Récapitulatif des différentes sources disponibles pour modéliser les maladies du foie	42

Liste des figures – Résultats :

Figure		Page
1	Optimisation du protocole de différenciation en endoderme	54
2	Morphologie caractéristique des hepatocytes dérivés des iPSCs à J25 de la différenciation	55
3	Expression de marqueurs hépatiques pour les 3 différentes populations à J25 par RT-qPCR	56
4	Détermination de l'expression des marqueurs hépatiques par immunocytochimie en fluorescence pour les 3 populations d'iPSCs	56
5	Mesure de la production d'albumine pour les 3 populations à J25 de la différenciation	58
6	Mesure de la synthèse d'urée des iHeps à J25 de la différenciation par test colorimétrique.	58
7	Mesure de l'activité du cytochrome P450 CYP3A4 pour les 3 populations par luminescence	59
8	Caractérisation de l'étape de l'endoderme définitif et évolution dynamique de l'expression génique	61
9	Expression des marqueurs de pluripotence dans les 3 populations d'iPSCs par RT-qPCR	63

10	Analyse en cytométrie en flux pour les marqueurs de pluripotence pour les 3 populations d'iPSCs	64
11	Détermination de l'expression des marqueurs de pluripotence par immunocytochimie en fluorescence pour les 3 populations d'iPSCs.	64
12	Détermination de la vitesse de prolifération des 3 populations d'iPSCs	65
13	Estimation du profile global de la méthylation de l'ADN par pyroséquençage pour les 3 populations d'iPSCs	66
14	Établissement de nouveaux marqueurs pour estimer l'état de pluripotence et donc la capacité de différenciation	67
15	Mesure de l'expression de H3K27me3 et YAP1 pour les 3 populations d'iPSCs par immunocytochimie en fluorescence	68
16	Évolution dynamique de l'expression génique au cours de la différenciation en endoderme	70
17	Effet du traitement avec l'hormone-peptide ELABELA sur l'expression des marqueurs de pluripotence et de l'endoderme	72

Liste des sigles:

AFP: *Alpha-fœto protein*
ALB: *Albumin*
ASGR1 : *Asialoglycoprotein Receptor 1*
BrdU: *Bromo-desoxy-uridine*
BMP : *Bone morphogenic protein*
CDX2 : *Caudal Type Homeobox 2*
CXCR4 : *Chemokine receptor type 4*
DE : *Definitive Endoderm*
ECM : *Extracellular matrix*
EGF : *Epidermal Growth Factor*
EMT: *Epithelial-Mesenchymal Transition*
EOMES: *Eomesodermin*
ESC : *Embryonic Stem Cell*
FGF : *Fibroblast Growth Factor*
FOXA2 : *Forkhead box protein 2*
GAPDH : *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*
GATA4 : *Transcription Factor GATA-4*
HGF : *Hepatocyte Growth Factor*
HHEX : *Hematopoietically-expressed homeobox protein*
ICM : *Inner Cell Mass*
iPSC: *induced Pluripotent Stem Cells*
KLF4: *Kruppel Like Factor 4*
LIF: *Leukemia Inhibitory Factor*
MAPK: *Mitogen-activated protein kinases*
MET: *Mesenchymal-Epithelial Transition*
MSC: *Mesenchymal Stem Cell*
OCT3/4: *Octamer-Binding Transcription Factor 4*
OSM: *Oncostatin M*
PBMC : *Peripheral Blood Mononuclear Cell*
PDL: *Population Doubling Level*
PROX1 : *Prospero homeobox protein 1*
RA : *Retinoic Acid*
REX1 (*Zfp-42*): *Zinc Finger Protein 42*
RLU : *relative luminescence unit*
SOX : *SRY-related HGM-box*
TGF- β 1 : *Transforming Growth Factor β 1*
TE : *Trophectoderm*
TET : *Ten-Eleven Translocation*

Liste des abréviations :

2D : 2 dimensions

3D : 3 dimensions

DEX : dexamethasone

g: force relative de la centrifugation

h : heure(s)

iHEPs: hepatocytes dérivés des iPSCs

min : min(s)

mL : millilitres

rpm : revolution per min

μL : microlitres

Sec: secondes

Ma mère, Julienne Diarra, me dit souvent ceci :

« Si tu n'as aucune foi en toi-même, tu es doublement vaincu dans la course de la vie. Avec la foi tu as gagné avant même d'avoir commencé. »

Marcus Garvey (1887-1940)

Remerciements :

Je tiens tout d'abord à adresser toute ma gratitude au Dr Paganelli, mon directeur de recherche. Merci d'avoir bien voulu m'accepter dans votre équipe et de m'avoir fait confiance. Merci pour les opportunités et les apprentissages inestimables. Sa supervision et son soutien m'ont encouragée à persévérer tout au long de ma maîtrise.

Mille mercis à Claudia Raggi, notre associée de recherche, sans qui, je n'aurais pas appris tout ce que je sais aujourd'hui. Sa supervision pendant toute ma maîtrise a été très enrichissante. Ses encouragements, sa confiance, ses conseils et son soutien m'ont permis de vouloir toujours aller plus loin.

Un immense merci à Toan Q. Pham qui, tout au long de mon séjour au laboratoire, a été comme un grand frère pour moi, d'un soutien et d'une gentillesse sans failles ainsi que d'une très grande patience !

Merci à Suleen Raad pour sa bonne humeur à toute épreuve et son soutien. Merci à Chenicka Mangahas, pour avoir toujours apporté avec elle son optimisme et son sens de l'humour.

Merci également à Cindy Weidmann pour sa patience et sa grande gentillesse.

Merci à Lisa-Marie Legault, pour avoir réalisé la partie méthylation de cette recherche. Toujours disponible et souriante !

Enfin, je remercie mes parents, Julienne Diarra & Richard McCallum qui ont toujours été présents pour moi, et sans lesquels je n'aurais pas pu aller au bout de mes rêves.

CHAPITRE I : INTRODUCTION

1.1 Avant-Propos :

Les maladies du foie touchent un canadien sur 10 [Canadian Liver Foundation 2013]. Il existe plus d'une centaine de maladies hépatiques qui peuvent être engendrées par divers facteurs et qui touchent aussi bien les enfants en bas âge que les adultes. La plupart de ces maladies évoluent progressivement vers la cirrhose, laquelle est souvent compliquée par de l'hypertension portale, saignements digestifs, ascite, carcinome hépatocellulaire, encéphalopathie et insuffisance hépatique. Ces conditions sévères et débilitantes causent 5000 décès par an au Canada et plus d'un million dans le monde. Pour beaucoup de maladies du foie aucun traitement n'est disponible et, une fois l'insuffisance hépatique développée, la transplantation de foie est la seule option disponible. Le manque d'options thérapeutiques dérive en bonne partie de la difficulté à étudier les maladies hépatiques *in vitro*. Les modèles cellulaires existants ont permis d'accroître nos connaissances de la physiologie du foie et de plusieurs mécanismes pathologiques, mais ils souffrent de plusieurs limites qui en réduisent l'utilité pour l'étude des maladies hépatiques complexes. Il est donc impératif de développer de nouveaux moyens d'études pour ces maladies afin de pouvoir trouver de nouvelles solutions.

En 2006, les cellules souches pluripotentes induites (iPSCs) ont été découvertes par le Dr Yamanaka. Les iPSCs ont la particularité de s'obtenir de n'importe quel type de cellules somatiques adultes et, en plus de s'auto-renouveler à l'infini, ces cellules sont pluripotentes : c'est-à-dire qu'elles sont capables par la suite de se différencier dans les trois feuillets embryonnaires (endoderme, mésoderme, ectoderme) et leurs dérivés. Ces cellules pouvant ainsi être obtenues directement à partir des cellules somatiques des patients souffrants de maladies génétiques du foie, sont capables de s'auto-renouveler à l'infini et ont la possibilité de se différencier en n'importe quel type cellulaire, y compris les hépatocytes. Suite à cela, de nombreux protocoles ont été établis afin de générer des cellules hépatiques à partir de ces iPSCs. Néanmoins, à ce jour, personne n'a réussi à obtenir des hépatocytes *in vitro* pleinement matures. Ceci

constitue donc un problème si l'on souhaite étudier certaines maladies du foie ou tester de nouvelles substances médicamenteuses. Mon projet a pour but l'amélioration de la différenciation des hépatocytes obtenus des iPSCs, afin d'obtenir des modèles *in vitro* plus représentatifs du foie humain sur lesquels étudier la physiopathologie et les traitements des maladies hépatiques.

1.2 La modélisation des maladies du foie : cellules candidates et approches disponibles

Afin de répondre à un besoin grandissant de modèles capables de nous permettre de mieux comprendre le développement, de prédire l'effet des médicaments ou encore de mieux contribuer à l'avancement de la recherche dans sa globalité, de nombreux modèles de culture cellulaire hépatiques ont été développés.

Le foie est impliqué dans un grand nombre de procédés métaboliques, ce qui en fait un organe complexe. Le choix d'un modèle par rapport à un autre dépend d'une part, évidemment de l'intérêt de la recherche, et également des caractéristiques de chaque modèle. C'est-à-dire que pour chaque type cellulaire proposé comme modèle, il faut prendre en considération si le modèle exprime les marqueurs et les fonctions métaboliques étudiées.

Ici seront abordées les caractéristiques des différents modèles existant lorsqu'il est question d'étude de maladies liées au foie.

1.2.1 Cellules Candidates

1.2.1.1 Hépatocytes Primaires

Les hépatocytes primaires fraîchement isolés sont le meilleur standard pour la conception de tels modèles, à cause du fait qu'ils expriment l'ensemble des marqueurs hépatiques et ont toutes les fonctions requises (1). Cependant, la qualité métabolique des hépatocytes obtenus de chaque isolation varie fortement en fonction de la méthode choisie ainsi que les caractéristiques du donneur (son âge, ainsi que les propriétés de son foie) (2). Pendant le processus d'isolation, les cellules commencent à se différencier et la polarité des hépatocytes, nécessaire au maintien de certaines fonctions importantes, est perdue (3).

En plus de se différencier, une fois en culture, les hépatocytes primaires ne prolifèrent pas (4), ce qui fait que les hépatocytes primaires seraient à considérer pour

des périodes d'expérimentation d'une courte durée. Un autre problème concernant l'utilisation des hépatocytes primaires reste le nombre limité d'organes disponibles.

1.2.1.2 Lignées dérivées de tumeurs hépatiques

Les lignées cellulaires dérivées des tissus tumoraux représentent également une source attractive pour étudier les mécanismes des maladies hépatiques. En effet, les lignées dérivées de tissus cancéreux ont pour points communs leur disponibilité ainsi que leur prolifération élevée (5). Afin d'étudier les maladies hépatiques, il existe différentes lignées cellulaires dérivées de cellules hépatiques cancéreuses :

1.2.1.3 HepG2

Les HepG2 sont des cellules dérivées d'un patient atteint d'un carcinome hépatocellulaire. Cette lignée a été pleinement caractérisée et est souvent utilisée pour tester les effets de médicaments sur ce type de cancer, ainsi que d'en étudier la physiopathologie. Le désavantage principal est que cette lignée est beaucoup moins représentative que les hépatocytes primaires. En effet, les HepG2 répondent moins bien aux inducteurs des enzymes du cytochrome P450, à l'inverse des hépatocytes primaires. Elles ne sont donc pas appropriées pour étudier la fonction métabolique du foie (6).

1.2.1.4 HepaRG

Les HepaRG sont des cellules à l'origine provenant d'une tumeur hépatique liée à une hépatite C chronique. Elles sont considérées comme bi-potentes : elles peuvent en effet se différencier en cholangiocytes et en hépatocytes. L'un des points forts non-négligeable de ces cellules est qu'elles sont capables de donner *in vitro* des cellules progénitrices hépatiques et de se différencier en hépatocytes presque matures polarisés et ayant une activité métabolique. Ces cellules expriment des gènes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques (7). Le point négatif de ces cellules

est qu'elles proviennent d'un même donneur donc contrairement aux hépatocytes primaires, il n'est pas possible d'étudier l'impact de différents allèles sur un gène donné.

1.2.1.5 Hépatocytes dérivés de cellules souches

Au-delà du fait que les cellules souches sont caractérisées par leur capacité à se différencier en types cellulaires spécifiques et à avoir une forte capacité à proliférer, elles sont également classées en fonction de leur potentiel de différenciation et de leur origine. Il existe, en effet, différentes sous-catégories : les cellules souches pluripotentes et les cellules souches multipotentes ayant un potentiel de différenciation beaucoup plus réduit que les précédentes.

1.2.1.6 Cellules souches mésenchymateuses

Les cellules souches mésenchymateuses (MSCs) sont généralement caractérisées comme étant des cellules stromales ayant la capacité de se différencier en plusieurs types cellulaires. Il est également possible de les trouver dans différents organes comme le cordon ombilical, la moelle osseuse, le tissu adipeux (8) et plus récemment le foie (8), ce qui en fait une source plus accessible que les hépatocytes primaires. Ces cellules possèdent une vitesse de prolifération élevée et arborent un profil d'expression spécifique (9). De plus, les MSCs auraient des probabilités de rejet amoindries, ainsi qu'une meilleure résistance au stress oxydatif (10). Les MSCs ont la capacité de se différencier en cellules hépatiques (11) : il s'agit d'un processus de transdifférenciation par le biais d'un contrôle strict de l'environnement des cellules en y mettant des facteurs de croissances ou autres substances spécifiques (12).

Le désavantage majeur de l'utilisation des MSCs serait leur incapacité à fournir des hépatocytes pleinement matures suite à la différenciation.

1.2.1.7 Cellules souches pluripotentes

Les cellules souches pluripotentes représentent depuis ces dernières années un fort potentiel dans de nombreux domaines de la recherche : aussi bien en médecine

régénérative et en développement, qu'en modélisation de maladies *in vitro* (13). Les cellules souches pluripotentes sont, en effet, de par leur capacité à proliférer rapidement et de manière constante, une source presque inépuisable de matériel à disposition de la recherche (14). Il existe cependant différents types de cellules souches pluripotentes : 1) les cellules souches embryonnaires et 2) les cellules souches pluripotentes induites (14).

1.2.1.7.1.1 Les cellules souches embryonnaires

Les cellules souches embryonnaires (ESCs) sont dérivées de la masse cellulaire interne (ICM) du blastocyste, stade embryonnaire précoce précédant l'implantation de l'embryon à l'utérus. Lorsque ces cellules dérivées de l'ICM sont cultivées dans des conditions spécifiques et appropriées, les cellules sont alors capables de maintenir leur pluripotence et leur prolifération (15). Le fait que les ESCs trouvent leur origine dans l'embryon soulève de nombreuses questions éthiques, ce qui en fait un point faible concernant leur exploitation (16).

Les ESCs sont capables, par la suite, de donner naissance, à l'image du stade de gastrulation, aux 3 feuillets embryonnaires à savoir : l'ectoderme, l'endoderme et le mésoderme, et à tous les tissus qui en dérivent (17). Cette caractéristique fondamentale permet donc d'utiliser les ESCs pour développer des modèles *in vitro* de maladies, en différenciant ces cellules dans le type cellulaire d'intérêt.

1.2.1.7.1.2 Les cellules souches pluripotentes induites

Les cellules souches pluripotentes induites (iPSCs), proviennent à l'origine de cellules somatiques adultes (e.g fibroblastes, cellules périphériques mononuclées du sang). Ces cellules à l'origine somatique ont subi une reprogrammation, c'est-à-dire une surexpression de facteurs spécifiques de pluripotence *KLF4*, *cMYC*, *OCT3/4* (*POU5F1*) & *SOX2*, dans le but de retrouver leur état de cellules pluripotentes semblables aux ESCs (18). Les iPSCs sont donc une alternative non-négligeable à l'utilisation des cellules souches embryonnaires, réglant ainsi à la fois les problèmes

d'éthique et d'obtention des cellules. Les iPSCs dérivées des cellules somatiques peuvent ainsi être utilisées à des fins thérapeutiques, notamment lors de la modélisation de maladies, d'essais de nouveaux médicaments et en thérapie cellulaire.

Il a déjà été démontré que les iPSCs et les ESCs étaient comparables en matière de pluripotence et de prolifération (19). Les années suivant la découverte des iPSCs, certaines recherches avaient démontré qu'il existait une mémoire épigénétique chez les iPSCs, héritées de leurs cellules somatiques d'origine (20). Néanmoins des recherches plus récentes ont contredit ce résultat, en démontrant que ce qui était caractérisé de mémoire épigénétique, était en fait dû au *background* génétique du donneur d'origine, et n'avait pas d'impact sur le potentiel de différenciation des iPSCs (21).

De nombreux protocoles de différenciation des ESCs et des iPSCs en cellules hépatiques existent déjà et permettent d'obtenir des cellules présentant la plupart des fonctions hépatiques (22). Cependant, les hépatocytes obtenus ne sont pas aussi matures que les hépatocytes primaires adultes, mais plutôt similaires aux hépatocytes

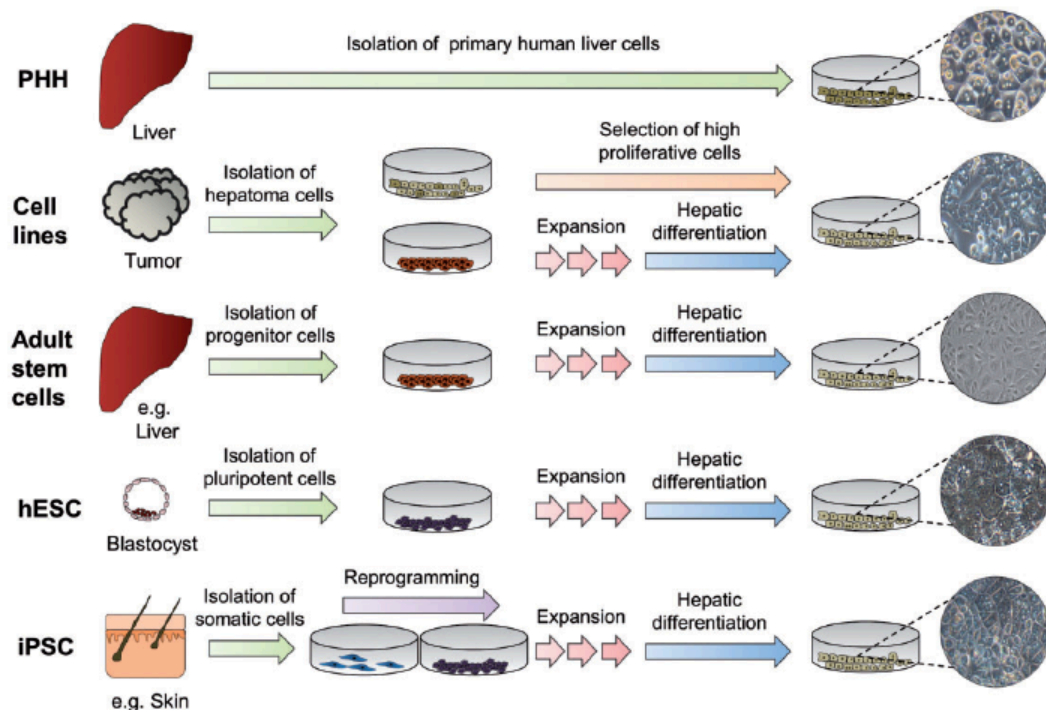


Figure 1. Récapitulatif des différentes sources disponibles pour modéliser les maladies du foie (1)

foëtaux tout en ayant certaines fonctions matures. Néanmoins, ces hépatocytes peuvent être utilisés pour développer des modèles *in vitro* et fournissent des résultats pertinents (23).

1.2.2 Les différentes approches de culture

1.2.2.1 Culture en 2D

Pour toutes les cellules énoncées précédemment, la culture en 2D, qui implique une monocouche de cellules, est la plus répandue et facilement réalisable. Un *coating* se rapprochant le plus des conditions *in vivo* est généralement recommandé, comme la laminine 521 reconnue pour supporter plusieurs types cellulaires et également présente dans le foie (24). Il existe néanmoins d'autres types de *coating* capables d'apporter un support lors de la culture des hépatocytes, à savoir, le Matrigel™, le collagène, la fibronectine composant de la matrice extracellulaire.

Cependant la culture en 2D, ne permet pas de reproduire le milieu hépatique au complet (25). En effet, la culture 2D ne favorise pas le plein potentiel des interactions entre cellules et ne permet donc pas aux cellules hépatiques de développer une polarité, qui est nécessaire au plein accomplissement de leurs fonctions (26).

De plus, ce type de culture notamment chez les hépatocytes primaires entraîne une dédifférenciation. En effet, le processus d'isolation des hépatocytes primaires engendre un stress ischémique provoquant une perturbation de l'architecture de l'organe. Ceci couplé à une réadaptation à l'environnement *in vitro* provoque une diminution de la transcription de gènes clés impliqués dans le maintien des fonctions hépatiques. En plus d'un changement morphologique des hépatocytes, se manifestant par une transition épithélial mésenchymateuse, une perte de la polarité est observée (27). La polarité des hépatocytes résulte de l'association des jonctions serrées et communicantes entre chaque cellule. La polarité cellulaire est essentielle au maintien des fonctions hépatiques. L'isolement des hépatocytes perturbe les jonctions ce qui engendre une perte de la polarité et participe donc à la perte des fonctions hépatiques. De même, lors du processus d'isolation, des composants cytosoliques, des antigènes de surface sont libérés, ce qui participe à l'augmentation de la dégradation protéique.

De surcroît, suite à cette perturbation, de nombreux facteurs de transcription clés rencontrent un déséquilibre au niveau de leur activation ou de leur synthèse, ce qui perturbe l'expression de gènes nécessaires pour faire face à ce stress (27).

D'autre part, l'environnement hépatique est complexe de par l'architecture même de l'organe, son microenvironnement et la composition de plusieurs autres types cellulaires participant au maintien fonctionnel des hépatocytes par le biais de leurs interactions. En effet, les hépatocytes seuls ne suffisent pas pour obtenir l'ensemble des fonctions hépatiques. Les autres types cellulaires hépatiques agissent conjointement par le biais de plusieurs mécanismes de communications tels que des voies de signalisation impliquant différentes cytokines et également que par la distribution de petites molécules via les jonctions communicantes et serrées. Ceci explique pourquoi la co-culture est également souvent envisagée (28).

Parmi les différents schémas de co-culture existant, il est possible souvent d'observer des hépatocytes cultivés avec des cellules endothéliales ou encore avec des cellules de Kupffer dépendamment, de l'intérêt de recherche.

La culture cellulaire en 2D a permis de découvrir et de comprendre de nombreux phénomènes et concepts mécanistiques cellulaires. Cependant, il a été démontré que la culture 2D avait des limites : elle ne permet pas à la cellule de développer son plein potentiel à cause du fait que les interactions entre les cellules sont limitées (29).

1.2.2.2 Culture en 3D

Afin de pallier aux limites de la culture 2D comme le niveau de maturation des cellules différenciées, et le manque d'interactions entre différents types cellulaires, la culture 3D est envisagée.

De plus, il a été montré qu'il y avait de grandes différences entre les cellules cultivées en 2D et en 3D (**Table I**), notamment du point de vue fonctionnel de la cellule, ce qui est crucial lorsque l'on cherche à étudier, entre autres, la physiopathologie ou le développement. En d'autres termes, ces différences sont observables au niveau de l'expression génique et du fait que les cellules abordent leur environnement d'une manière différente lorsqu'elles sont cultivées en monocouche versus en 3D.

Les interactions entre les différents types cellulaires sont plus représentatives en culture 3D à cause de l'augmentation de l'exploitation des différents plans des cellules. Par exemple, le fait que les cellules soient cultivées sur un seul plan a pour conséquence qu'une seule face des cellules est exposée aux autres cellules et à la matrice extracellulaire (30). De même, l'activité paracrine est supérieure dans ce modèle de culture. En effet, les sécrétions paracrines des différents types cellulaires impliqués au niveau du foie occupent un rôle central pour l'établissement et le maintien des fonctions hépatiques. Effectivement, il a été démontré que certaines sécrétions paracrines sont indépendantes du contact entre les cellules, mais sont nécessaires pour le maintien de l'intégrité du foie (31). De plus, en culture 3D, comme dans le foie *in vivo*, les cellules sont généralement en contact avec des gradients de facteurs de croissance, tandis qu'en culture 2D, chaque cellule est exposée à la même concentration contenue dans le milieu de culture (32). La morphologie des cellules joue également un rôle, et en 2D les cellules ont moins de liberté morphologique par rapport au 3D (33). Pour toutes ces raisons, il a été démontré que les cellules se comportaient de façon plus similaire à l'*in vivo* lorsqu'elles étaient cultivées en 3D.

Toujours dans l'idée de perfectionner les conditions de culture *in vitro*, de nouveaux matériaux, comme des échafaudages mimant la matrice extracellulaire (ECM), ont été introduits en culture 3D. Ces matériaux possèdent des micropores permettant l'échange de protéines et des nanofibres permettant de reproduire au mieux la morphologie des protéines composant l'ECM (34).

1.2.2.3 Culture tissulaire

La culture tissulaire permet également d'obtenir des hépatocytes primaires adultes ainsi que les autres types cellulaires impliqués dans le maintien des fonctions hépatiques. Cette technique emploie des morceaux de foie provenant de donneurs d'organes, de biopsies ou de cadavres (35). Cependant, au même titre que pour les hépatocytes primaires, il est difficile de les maintenir en culture à cause de la dédifférenciation rapides (36).

Tableau I. Différences entre la culture cellulaire en 2-dimensions et en 3-dimensions. Extrait de Edmondson R. et al 2014.

Cellular characteristics	2D	3D
Morphology	Sheet-like flat and stretched cells in monolayer	Natural shape in spheroid/aggregate structures
Proliferation	Often proliferate at a faster rate than <i>in vivo</i>	May proliferate at a faster/slower rate compared to 2D-cultured cells depending on cell type and/or type of 3D model system
Exposure to medium/drugs	Cells in monolayer are equally exposed to nutrients/growth factors/drugs that are distributed in growth medium	Nutrients and growth factors or drugs may not be able to fully penetrate the spheroid, reaching cells near the core
Stage of cell cycle	More cells are likely to be in the same stage of cell cycle due to being equally exposed to medium	Spheroids contain proliferating, quiescent, hypoxic and necrotic cells
Gene/protein expression	Often display differential gene and protein expression levels compared to <i>in vivo</i> models	Cells often exhibit gene/protein expression profiles more similar to those <i>in vivo</i> tissue origins
Drug sensitivity	Cells often succumb to treatment and drugs appear to be very effective	Cells are often more resistant to treatment compared to those in 2D culture system, often being better predictors of <i>in vivo</i> drug responses

2D, two-dimensional; 3D, three-dimensional.

1.3 Hépatocytes dérivés de cellules souches pluripotentes induites

1.3.1 Des cellules somatiques aux cellules pluripotentes

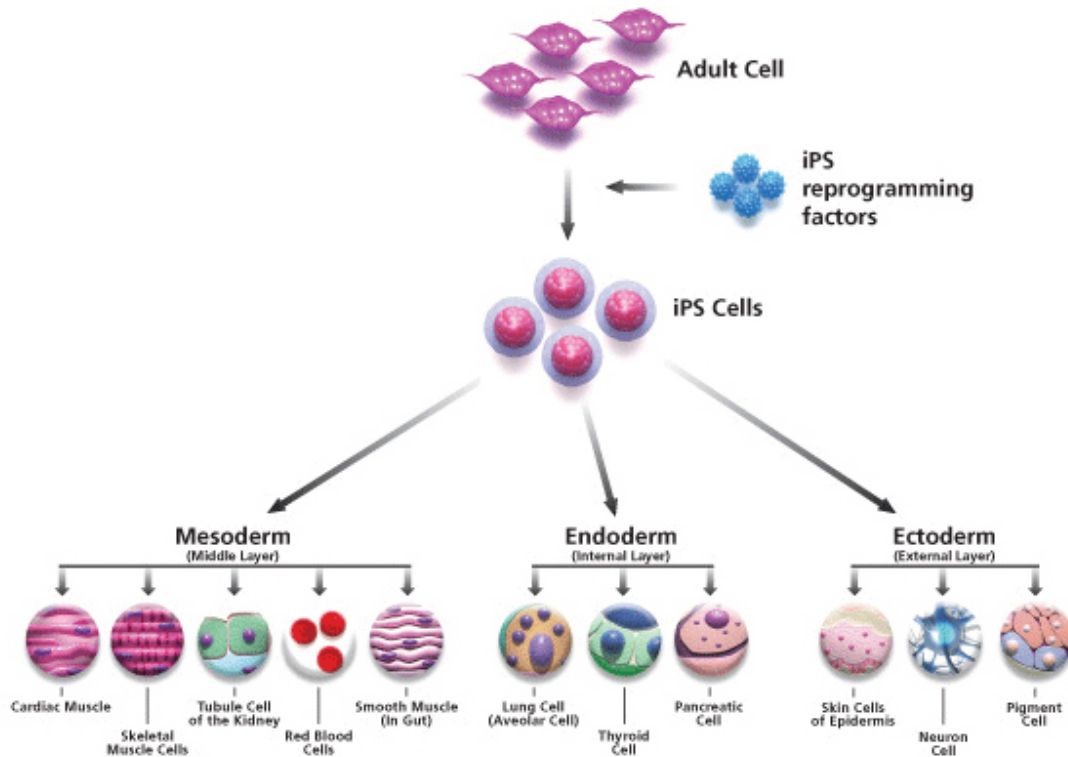


Figure 2. Phénomène de reprogrammation : d'une cellule somatique adulte à une cellule souche pluripotente induite (iPSC) capable de se différencier dans les 3 feuilles embryonnaires (Marks Jacob, Yale Scientific, 2014)

Les cellules souches pluripotentes induites (iPSCs), sont des cellules souches provenant de cellules adultes somatiques. En 2006, Yamanaka et Takahashi ont démontré qu'en surexprimant dans des cellules somatiques des facteurs de pluripotence tels *OCT3/4* (*POU5F1*) (O), *SOX2* (S), *KLF4* (K), *cMYC* (M) et, via un vecteur rétroviral, il était possible d'obtenir des cellules souches pluripotentes similaires aux cellules embryonnaires. (**Figure 2**).

Afin d'avoir une poussée suffisamment forte pour reprogrammer les cellules, les facteurs OSKM doivent être exprimés dans des conditions stœchiométriques très précises.

OCT3/4, SOX2 sont essentiels pour la reprogrammation en iPSCs, ces 2 facteurs avec NANOG constituent le noyau de la pluripotence, ils permettent le maintien de l'identité pluripotente de la cellule. En plus de promouvoir la prolifération, cMYC est connu pour jouer de nombreux rôles dans ce processus tels que l'induction de l'acétylation d'histone, son action sur l'acétylation globale des histones permet à SOX2 et OCT3/4 de se lier à leurs cibles. KLF4, de par son action permet d'augmenter l'expression de NANOG en réprimant p53 (37). De plus, l'ensemble de ces facteurs appelés OSKM, interagissent avec la chromatine afin de pouvoir rendre accessibles les régions chromatiques fermées, afin que les gènes relatifs à la pluripotence puissent être ré-activés. Néanmoins le mécanisme par lequel cela se produit est encore méconnu (38).

Le processus de reprogrammation entraîne de grands changements non seulement aux niveaux : morphologique et de l'expression génique, mais aussi épigénétique. La reprogrammation se compose de 3 phases : une phase d'initiation, de maturation et de stabilisation. Une série d'événements surviennent durant les différentes phases et sont propres à chaque étape. Lors de la phase d'induction, il y a la perte de l'ensemble des caractéristiques liées à l'identité de la cellules somatiques. De plus, d'importants changements métaboliques et morphologiques, soit une transition mésenchymato-épithéliale (MET), ont lieu, accompagnés par l'augmentation de la vitesse de prolifération pendant cette phase d'induction (39). Lors de la phase de maturation, les cellules commencent à exprimer des marqueurs de pluripotence, ainsi qu'à acquérir une indépendance des facteurs de transcription surexprimés. Pendant la phase de stabilisation, les cellules sont considérées comme des iPSCs, car elles expriment encore plus de gènes relatifs à la pluripotence. Il y a également une perte de la mémoire épigénétique, ainsi qu'une réactivation du chromosome X pour les cellules issues de femmes (**Figure 3**). Au cours des différentes étapes de la reprogrammation, l'expression génique subit de nombreux changements et à chaque stade de la reprogrammation, les iPSCs en devenir expriment des marqueurs clés. De plus globalement, la transition de cellules somatiques adultes vers les cellules souches pluripotentes, s'accompagne, entre autres, d'une modification du cycle cellulaire (40), ainsi que d'une augmentation du métabolisme (41).

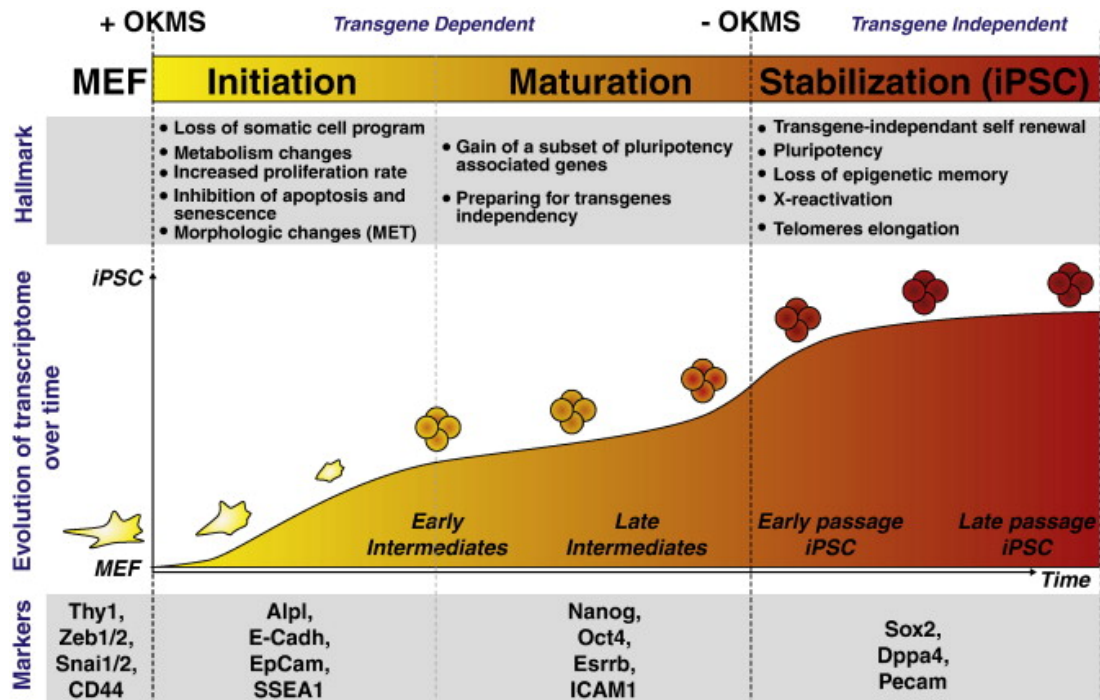


Figure 3 : Les étapes du processus de reprogrammation (39)

D'un point de vue épigénétique, l'ensemble des événements menant du stade différencié vers le stade indifférencié reste encore méconnu. Cependant, une réorganisation de l'ensemble de la chromatine a lieu et le processus de reprogrammation engendre des modifications épigénétiques dans le but de réactiver les gènes liés à la pluripotence. Une balance entre la méthylation et la déméthylation de l'ADN, régulées respectivement par les méthyltransférases et les déméthylases, s'établit et permet de déterminer si la cellule somatique sera reprogrammée ou restera différenciée. Cependant l'un des mécanismes les plus importants au niveau du remodelage épigénétique durant la reprogrammation demeure la déméthylation de l'ADN contrôlée par les enzymes TET (TET1, TET2 & TET3) (42). Ces enzymes interagissent entre autres avec *NANOG*, *OCT3/4 (POU5F1)* et *SOX2* qui les recrutent vers des gènes cibles afin d'induire la déméthylation de l'ADN, ainsi que la réactivation des gènes importants pour la pluripotence (43). Chez la souris *Nanog* permet le maintien du statut indifférencié des cellules pluripotente, en effet, il inhibe les BMPs impliqués dans la promotion de la différenciation, en interagissant avec *SMAD1* (44).

Le facteur de transcription OCT3/4, de même empêche l'activation de gènes qui promeuvent la différenciation. KLF4 est une cible directe d'OCT3/4, gène également impliqué dans le maintien de la pluripotence (45). De plus, OCT3/4 coopère avec la voie de signalisation LIF, voie cruciale pour la maintenance de la pluripotence. SOX2, autre facteur de transcription, est connu pour être indispensable lors du développement embryonnaire. En effet, SOX2 active, entre autres, NANOG en interagissant avec OCT3/4, afin de promouvoir l'auto-renouvellement en activant d'autres gènes liés à la pluripotence et en réprimant ceux favorisant la progression du développement (46).

Suite à la reprogrammation, une fois que les iPSCs sont obtenues à partir des cellules somatiques adultes, il est alors possible de les différencier dans le type cellulaire d'intérêt (**Figure 2**).

1.3.2 Mimer l'organogenèse du foie pour générer des hépatocytes à partir des iPSCs

Le foie est un organe complexe et essentiel pour de nombreuses fonctions métaboliques telles que le métabolisme des xénobiotiques, le stockage de glycogène, la synthèse et le transport de cholestérol, le métabolisme de l'urée etc. L'architecture du foie, essentielle à son plein fonctionnement, est composée à la fois de cellules parenchymateuses, les hépatocytes, s'organisant avec des cellules non-parenchymateuses telles que les cellules endothéliales sinusoïdales, les cellules de Kupffer (ou les macrophages hépatiques), les cellules stellaires hépatiques et les cholangiocytes (47). Ici seront abordées les différentes étapes clés de l'organogenèse du foie nécessaires pour comprendre comment arriver à différencier les iPSCs en hépatocytes composant 70% des types cellulaires hépatiques.

1.3.2.1 Premières spécifications cellulaires :

Au niveau de l'embryon, la première spécification cellulaire a lieu durant la formation du trophoctoderme (TE) et de la masse cellulaire interne (ICM). En effet,

après fécondation, une succession de divisions cellulaires a lieu, afin de donner naissance à des blastomères qui vont former la masse cellulaire interne et le TE. Le TE prend les caractéristiques d'un épithélium, et suite à la formation de cet épithélium, une cavité se forme : le blastocœle (48).

A ce stade, *OCT3/4 (POU5F1)* est exprimé spécifiquement par les cellules composant l'ICM et est nécessaire afin que ces cellules ne se différencient pas en TE. Réciproquement, *CDX2*, exprimé localement par les cellules du TE, est nécessaire afin que le TE ne perde pas sa caractéristique d'épithélium et conserve le blastocœle (48) (**Figure 4**).

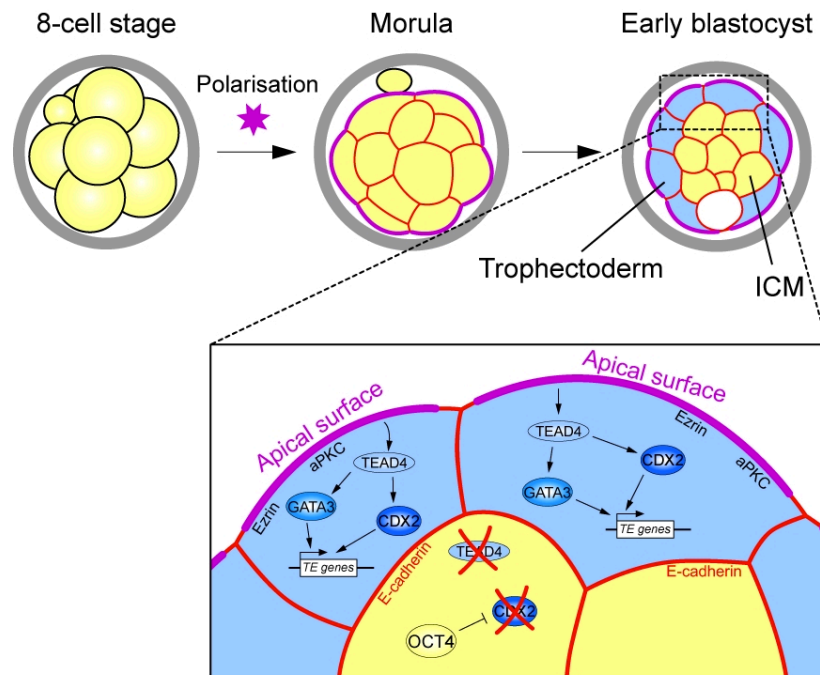


Figure 4 : Différenciation du trophoctoderme et de la masse cellulaire interne (49)

Par la suite, l'ICM va se différencier en épiblaste et en hypoblaste : l'hypoblaste donnera naissance à l'endoderme primitif et ses tissus dérivés et l'épiblaste formera le feuillet externe à l'embryon et engendrera, entre autres, le système nerveux et les organes sensoriels.

Le mécanisme de ségrégation entre l'épiblaste et l'hypoblaste n'est pas encore connu, cependant de nombreux modèles et théories existent. D'après certaines de ces

théories, chez la souris, l'ensemble des cellules composant l'ICM expriment à la fois, *Nanog*, *Sox2*, *Gata6*, *Pdgfra* et *Oct3/4* (*Pou5f1*). *Gata6*, régulateur précoce de l'hypoblaste, est nécessaire pour l'expression de *Pdgfra*. *Pdgfra*, une fois activé favorise la prolifération des cellules de l'hypoblaste (50).

Durant la ségrégation entre l'hypoblaste et l'épiblaste, seuls les précurseurs de l'épiblaste se mettent à exprimer *Nanog*, tandis que les précurseurs de l'hypoblaste exprimeraient *GATA6* (49). Le fait que les deux types de précurseurs expriment soit *NANOG* ou *GATA6* serait en lien avec le gradient de *FGF4*, cible de *OCT3/4* (*POU5F1*), sécrété par l'ICM. Néanmoins les mécanismes d'activation de l'ensemble de ses facteurs importants pour cette différenciation cellulaire reste à élucider (51).

En effet, une faible concentration de FGF4 orienterait les cellules vers l'épiblaste, tandis qu'une forte concentration amènerait les cellules vers l'hypoblaste. Par la suite, la répartition des deux types cellulaires alors placés au préalable de façon aléatoire au niveau de l'ICM, serait due à la migration des cellules de l'hypoblaste vers la surface de l'ICM exposé à la cavité (49) (**Figure 5**).

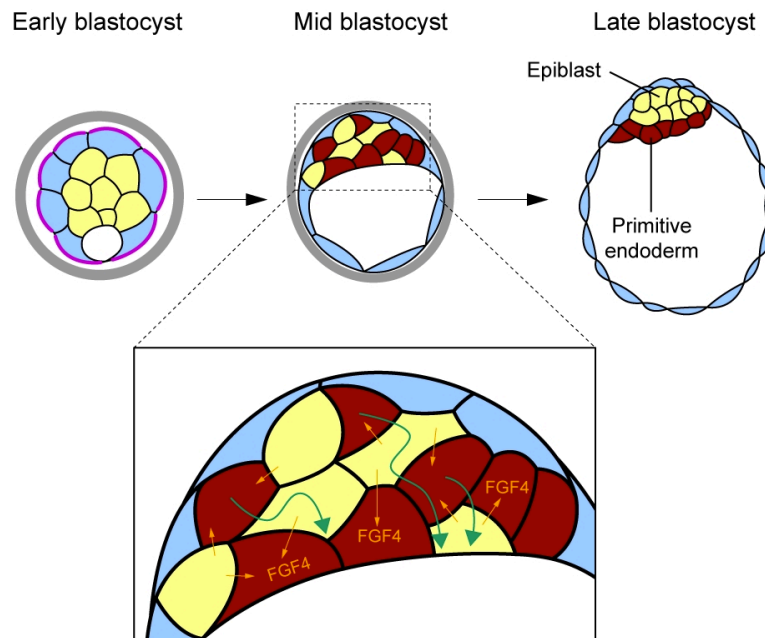


Figure 5 : Ségrégation entre l'épiblaste et l'hypoblaste (49)

Les cellules de l'épiblaste sont pluripotentes, et le maintien de cette pluripotence est assurée par la voie de signalisation du Nodal et par la voie du WNT/Beta-Caténine. Ces deux voies de signalisation jouent des rôles doubles, car elles sont aussi bien capables de maintenir la pluripotence que d'induire la différenciation (52, 53).

1.3.2.2 Ligne primitive & Endoderme Définitif :

De nombreuses études réalisées sur la souris, le zebrafish et le medaka, ont permis de mettre en lumière les voies de signalisation essentielles pour atteindre le feuillet embryonnaire de l'endoderme définitif (DE). La formation de la ligne primitive (de l'anglais « *primitive streak* ») est cruciale pour l'établissement avec succès du DE ; il s'agit en effet d'une structure transitoire qui marque le début de la gastrulation (54). Une partie de l'épiblaste sert à former cette ligne primitive. En effet lors de la gastrulation, des cellules composant l'épiblaste migrent le long de l'axe longitudinal-dorsal et en fonction de leur position par rapport à cet axe, elles vont donner naissance soit à l'ectoderme en restant au niveau de l'épiblaste, à l'endoderme en s'intercalant avec des cellules de l'hypoblaste, ou au mésoderme en étant positionnées entre l'épiblaste et l'hypoblaste (55). Le mouvement des cellules est régulé, entre autres, par la voie de signalisation FGF et WNT/Beta-Caténine. Fgfr1 est impliqué dans la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) indispensable à l'ingression de l'épiblaste. Tandis que, FGF8 semble être requis pour la répartition des cellules épiblastiques pour la formation de la ligne primitive (56). L'étude du mouvement des cellules lors de la gastrulation a principalement été étudié chez le zebrafish. Il a été démontré, que la voie Wnt/Beta-Caténine active Stat3 qui va par la suite permettre la migration des cellules lors de la gastrulation, ce qui permet d'obtenir les axes embryonnaires. Néanmoins les mécanismes moléculaires impliqués dans ce processus sont toujours méconnus. Chez le zébrafish, la voie Wnt/Beta-caténine, active Stat3 via une Dharma/Bozozok et Squint, une protéine favorisant le mésendoderme (57).

La voie de signalisation qui entre également en jeu lors de la formation de la ligne primitive et de l'endoderme est la voie Nodal/Activine A ; comme beaucoup d'autres

voies de signalisation, elle agit de manière dépendante à la concentration. En effet, cette voie est capable d'induire à la fois les dérivés antérieurs et postérieurs de la ligne primitive ; à forte concentration elle induit préférentiellement les dérivés antérieurs tandis qu'à faible concentration, elle induit plutôt la partie postérieure (56). De plus, *FOXA2* commence à être exprimé durant l'étape de la formation de la lignée primitive, ce gène est important car il a un impact déterminant sur la voie hépatique qu'empruntent les cellules par la suite (58, 59).

1.3.2.3 Endoderme Hépatique :

Une fois l'endoderme définitif établi, l'induction de la spécification hépatique de l'endoderme peut débuter. L'induction hépatique, *in vivo*, est le résultat de nombreux événements biologiques contrôlés par différents mécanismes et divers signaux permettant de favoriser soit la prolifération, soit la différenciation ou encore l'apoptose des cellules. Une fois que l'endoderme définitif est établi durant la gastrulation, celui va former l'intestin primitif subdivisé en 3 parties : la partie antérieure du tube digestif (« *foregut* »), l'intestin moyen (« *midgut* ») et l'intestin postérieur (« *hindgut* »). Le foie dérive de la portion postérieure du « *foregut* » (47).

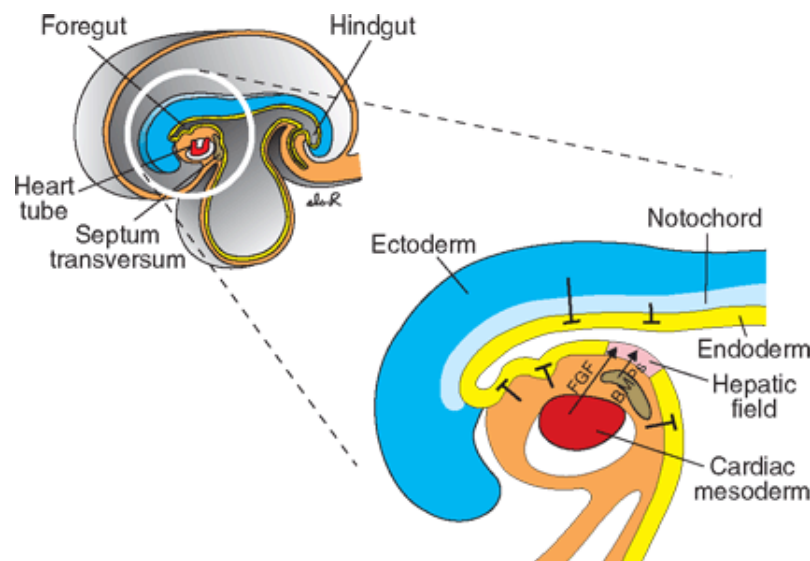


Figure 6 : Importance de la proximité du mésoderme cardiaque et du septum transverse pour l'induction hépatique (60)

Lors de l'organogenèse du foie, le mésoderme cardiaque et le septum transverse se retrouvent adjacents à la partie ventrale de la partie antérieure de l'intestin (59). Les cellules mésenchymateuses du septum transverse proches du futur endoderme hépatique expriment fortement *GATA4*. Ce facteur de transcription contrôle, entre autres, l'expression de la protéine morphogénétique osseuse 4 (BMP4) sécrétée par le septum transverse. Par ailleurs, le mésoderme cardiaque sécrète de nombreux facteurs de croissance des fibroblastes (FGF) tels que *FGF1*, *FGF2*, *FGF10*, qui ont une action redondante concernant l'induction hépatique (61). L'activation de la voie de signalisation MAPK par le biais de *FGF* permet l'expression de gènes hépatiques (47). BMP4 et FGF2 permettent simultanément le début de l'hépatogenèse à partir de l'endoderme (**Figure 6**). L'ensemble des FGFs agit à différents stades de l'organogenèse hépatique : FGF1 & 2, permettent l'induction, tandis que FGF8 favorise *in vivo* la croissance du bourgeon hépatique, en plus de permettre la prolifération, et des changements morphologiques au niveau des hépatocytes fœtaux (59). De plus, les cellules expriment *HHEX*, un facteur impliqué dans le développement des organes dérivant de l'endoderme, qui est essentiel pour obtenir un foie pleinement fonctionnel. *HHEX* joue un rôle clé dès l'établissement de la partie antérieure de l'intestin : il permet d'induire la prolifération et la migration des cellules en fonction de la sécrétion de FGF (62). *HHEX* est également nécessaire pour les événements plus tardifs de l'établissement du foie (47).

GATA4, continue également à être exprimé suite à l'influence de BMP4 et FGF2. Ce facteur avec *FOXA2*, joue un rôle déterminant dans le stade précédant l'emprunt de la voie hépatique. En effet, ces facteurs de transcription sont connus pour interagir au niveau de la chromatine et ainsi la décompacter, afin d'initier, au moment opportun, l'expression de l'ARNm de l'albumine. Ces facteurs ne sont pas engagés qu'avec un seul gène hépatique. Cependant, d'autres études doivent être menées afin de déterminer s'ils sont capables d'agir afin de favoriser l'expression d'autres gènes indispensables pour l'établissement de la voie hépatique (59).

En plus des voies de signalisation BMP et FGF, la voie du WNT/Beta-Caténine est également impliquée à ce niveau de la différenciation, et participe également à l'induction de l'hépatogenèse. Dans certaines études, la voie de signalisation WNT/Beta-Caténine est indispensable pour obtenir des cellules progénitrices hépatiques. Néanmoins son rôle à cette étape de la différenciation reste controversé et méconnu (61). En effet, la voie WNT/Beta-Caténine est impliquée dans de nombreux processus biologiques comme l'auto-renouveau, la prolifération et la migration cellulaires, l'apoptose, la différenciation, l'établissement de la zonation du foie, l'adhérence ainsi que dans le métabolisme de nombreuses cellules hépatiques. Au niveau du développement embryonnaire du foie, WNT/Beta-Caténine joue un rôle non seulement au niveau de l'induction embryonnaire mais aussi, au niveau de l'établissement de la polarité ainsi que de la spécification cellulaire. Plus précisément, la voie du WNT/Beta-Caténine est centrale pour la transition épithélio-mésenchymateuse impliquée à de nombreuses reprises dans l'organogenèse du foie (e.g établissement de la ligne primitive section 1.3.2). La régulation de la voie de signalisation WNT/Beta-Caténine est complexe de par son expression spatio-temporelle. Ceci explique donc que des études se contredisent concernant l'importance de cette voie de signalisation. Durant l'induction hépatique, certaines études ont démontré que la voie du WNT/Béta-Caténine était inhibée (63), tandis que d'autres ont démontré l'inverse (64).

1.3.2.4 Hépatoblastes

Après l'induction hépatique, il commence à y avoir une expression de marqueurs hépatiques précoces tels que l'albumine (*ALB*) et l'alpha-foeto-protéine (*AFP*) ainsi que le facteur nucléaire d'hépatocytes 4 alpha (*HNF4A*). À ce stade, l'endoderme hépatique est entouré par une couche basale composée entre autres de laminine, de fibronectine, de nidogène et de collagène. Cette couche basale va par la suite se fracturer et les hépatoblastes vont migrer dans le but de former un bourgeon hépatique au niveau du septum transverse (**Figure 7**). *HHEX* exprimé auparavant est notamment nécessaire

pour cette étape, ce facteur permet le succès de la délamination des hépatoblastes. Effectivement, lorsque les hépatoblastes ne se délaminent pas, l'expression des marqueurs hépatiques précoces ne perdure pas (62)

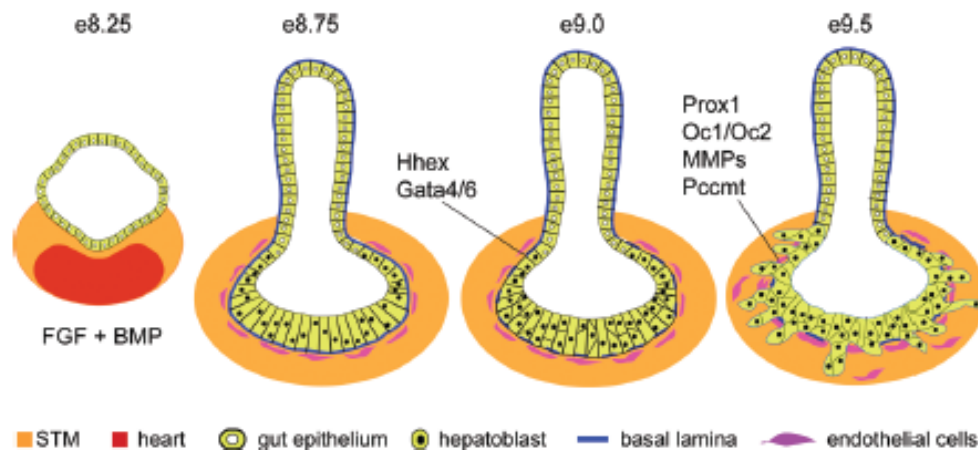


Figure 7 : Formation du bourgeon hépatique suite à l'influence des facteurs FGF & BMP4. (62)

De même les facteurs *PROX1* et *OCT1/2* participent également au processus de délamination : *PROX1* est exprimé au niveau de l'épithélium hépatique tandis que *OCT1* et *-2* sont exprimés aussi bien au niveau de l'endoderme de la partie antérieure du tube digestif et des hépatoblastes en devenir (62).

Les cellules du mésenchyme du septum transverse ainsi que les cellules stellaires secrètent un grand nombre de facteurs ayant pour but de soutenir la prolifération et la migration des cellules hépatiques. Parmi ces facteurs se trouvent notamment, l'EGF, l'HGF, l'acide rétinoïque (65). À cette étape de la différenciation *in vitro*, l'utilisation de facteurs tels que *HGF* (*Hepatocyte growth factor*) permet de stimuler la prolifération des hépatoblastes (66). En effet, ce stade étant critique suite à la délamination des hépatoblastes, il est nécessaire de faire en sorte de perdre le moins de cellules possibles. L'acide rétinoïque (RA) joue un rôle au niveau des cellules stellaires et ainsi qu'au niveau morphogénique du foie (61). De plus, le RA aurait un effet indirect sur la prolifération des hépatoblastes (67). Le facteur de croissance épidermique (*EGF*) agit

lui au niveau de la formation de l'épithélium biliaire ainsi que la formation des tissus connectifs (68).

1.3.2.5 Hépatocytes :

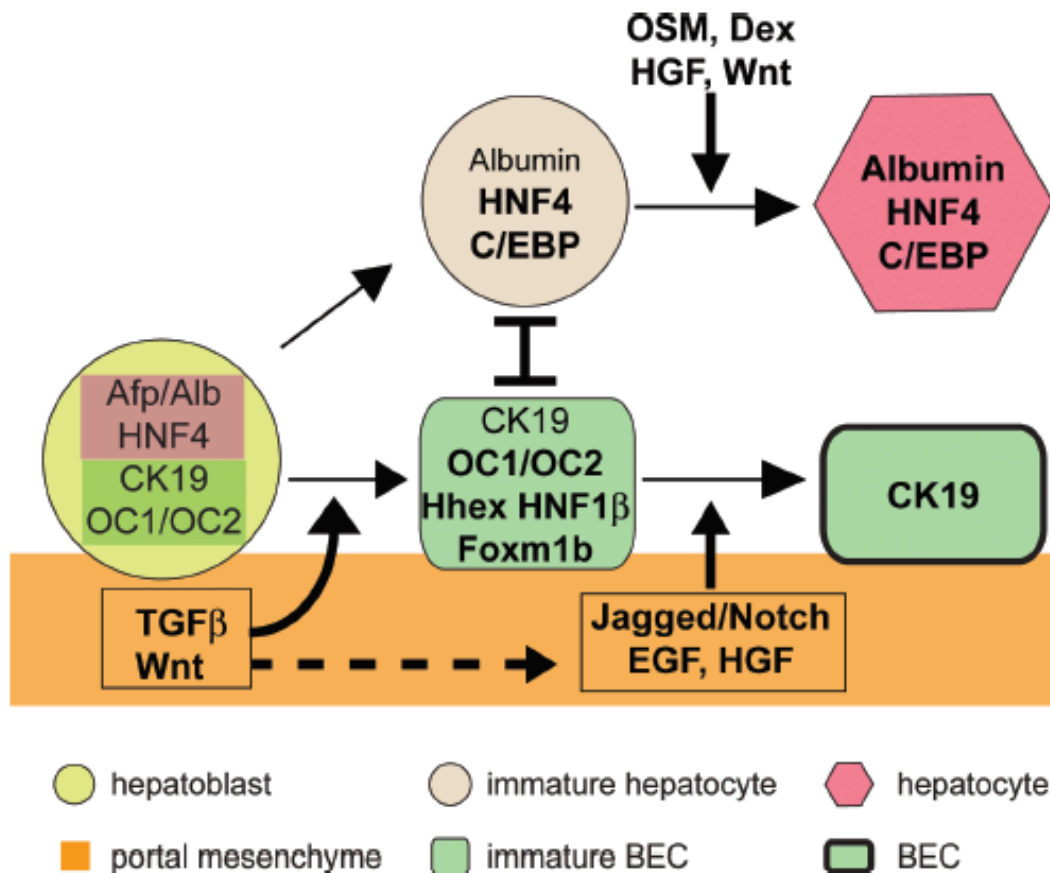


Figure 8 : Différenciation des hépatoblastes suite à l'influence de l'OSM & du dexaméthasone (62)

Lors de l'organogenèse du foie, les cellules hématopoïétiques sécrètent de l'Oncostatine M (OSM) qui joue un rôle de support pour la différenciation en hépatocytes (**Figure 8**), lorsqu'elle agit en combinaison avec HGF, WNT et d'autres hormones glucocorticoïdes (62). L'OSM induit la maturation métabolique par le biais de la voie de signalisation JAK/STAT3 (69). De plus, l'OSM induit les changements morphologiques (70) et joue un rôle dans la polarisation de la membrane des hépatocytes par le biais de l'E-Cadhérine (71).

Le dexaméthasone (DEX) est connu pour empêcher l'apoptose chez les hépatocytes primaires (72). De plus il est connu pour accentuer la différenciation des hépatocytes aussi bien d'un point de vue morphologique que d'un point de vue métabolique (73). Il est capable d'induire l'expression d'enzymes métaboliques clés telles que argininosuccinate synthétase, d'autres enzymes du cytochrome P450 et la tyrosine aminotransférase (74).

Cependant *in vitro*, il est à ce jour impossible d'obtenir des hépatocytes pleinement matures. En effet, les hépatocytes différenciés expriment à la fin de la différenciation de hauts niveaux d'AFP, qui est considéré comme un marqueur hépatique fœtal et néonatal précoce et dont l'expression diminue rapidement après la naissance (75). Néanmoins, les hépatocytes obtenus suite à la différenciation expriment également des marqueurs hautement exprimés chez les hépatocytes adultes comme l'ASGR1, l'Albumine, l'E-cadhérine.

1.3.3 Caractérisation des hépatocytes dérivés des iPSCs

Une fois la différenciation des hépatocytes *in vitro* achevée, il est nécessaire d'attester de la qualité des hépatocytes obtenus. Ceci passe par une caractérisation à la fois génique et protéique, mais aussi fonctionnelle.

D'un point de vue expression génique, suite à la différenciation, l'expression de gènes tels que ALB, AFP, ASGR1 et HFN4A, habituellement fortement exprimés chez des hépatocytes adultes est évaluée. Ces marqueurs sont également recherchés au niveau protéique en plus de l'E-cadhérine présente dans les jonctions serrées.

D'un point de vue fonctionnel, la synthèse d'urée, la production d'albumine ainsi que l'activité du CYP3A4 sont aussi testées à la fin de la différenciation.

1.4 Les différences entre les populations d'iPSCs et leurs impacts sur le potentiel de différenciation

1.4.1 États de pluripotence : pluripotence naïve versus pluripotence amorcée

Table II : Caractéristiques de la pluripotence naïve et amorcée. (76)

Property	Naïve state	Primed state
Origin	ICM of early blastocyst	Post-implantation epiblast (Egg cylinder) or embryonic disc
Representative examples	mESCs, miPSCs	mEpiSCs, hESCs, hiPSCs
Expressed genes ¹	High expression of <i>Oct4</i> , <i>Nanog</i> , <i>Sox2</i> , <i>Klf2</i> , <i>Klf4</i> , <i>Klf5</i> , <i>Zpf42</i> , <i>Esrrb</i> , <i>Dppa3</i> , <i>Tfcp2l1</i> , <i>Fgf4</i> , <i>Tbx3</i> , <i>Cdh1</i>	<i>Oct4</i> , <i>Sox2</i> , <i>Dnmt3b</i> , <i>Fgf5</i> , <i>Pou3f1</i> , <i>Meis1</i> , <i>Otx2</i> , <i>Sox11</i> , <i>Gdf3</i>
Colony morphology	Compact dome shaped	Flattened
Differentiation bias	None	Variable
Teratoma	Yes	Yes
Chimeric contribution in rodents ²	Yes	No
Clonogenicity	High	Low
Single-cell mortality	Low	High
Growth factor dependence	LIF	ACTIVIN, FGF2
Respiration	Oxidative phosphorylation, glycolysis	Glycolysis
XCI status in female cells	XaXa	XaXi

À partir des ESCs, plusieurs stades de pluripotence ont été définis : i) l'état naïf fondamental et ii) l'état amorcé (« *primed* ») (76).

L'état naïf fondamental représente le statut de la cellule à l'étape de pré-implantation de l'embryon, il prend forme à partir de l'ICM (section 1.3.2) et se prolonge jusqu'au stade de l'épiblaste mature du blastocyste, tandis que l'état amorcé correspond à l'étape de post-implantation de l'embryon. Les ESCs dérivées de la masse cellulaire interne, représentent cet épiblaste *in vitro*. D'une étape à l'autre, la pluripotence de la cellule embryonnaire change, en effet de grandes différences existent entre ces 2 stades (**Table 2**).

Les cellules à l'état naïf fondamental ont une capacité de prolifération plus élevée que celles à l'état amorcé. De plus, les marqueurs de pluripotence exprimés sont différents : les cellules naïves expriment en plus d'*OCT3/4 (POU5F1)*, *NANOG* et *SOX2*, à la différence des cellules à l'état amorcé : *KLF2* et *KLF4*. Les cellules naïves expriment également des marqueurs qui leur sont propres : *REX1*, *NROB1*, *FGF4*, ces marqueurs sont absents des cellules amorcées. D'un point de vue épigénétique, les cellules naïves ont tendance à être hypométhylées, tandis que les cellules amorcées ont un génome plus méthylé que les précédentes (76, 77).

Lors du passage de l'état fondamental naïf à l'état amorcé, de grands changements opèrent au sein de la cellule, notamment d'un point de vue épigénétique. En effet, il y a une réorganisation de l'ensemble paysage épigénétique, notamment au niveau de la chromatine associée aux amplificateurs, ainsi qu'une réorganisation de la liaison d'*OCT3/4 (POU5F1)*. *OCT3/4* associé aux amplificateurs des gènes de pluripotence naïve établit des liaisons avec de nouveaux amplificateurs associés avec des gènes de pluripotence amorcée (78)(**Figure 9**).

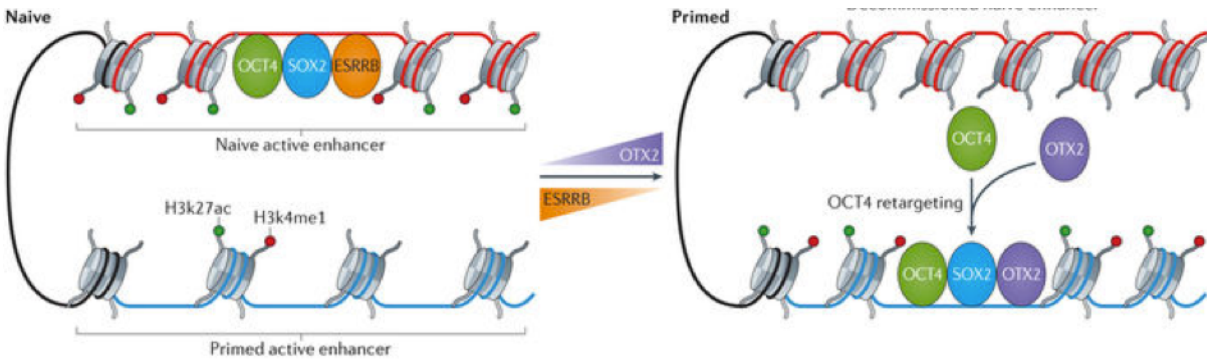


Figure 9 : Changement du paysage épigénétique entre pluripotence naïve et amorcée. (78)

Le statut fondamental naïf peut être maintenu *in vitro*, mais il est nécessaire d'adapter les conditions de culture. En effet, le maintien de la pluripotence naïve en culture dépend grandement de facteurs exogènes, notamment du facteur inhibiteur de leucémie (LIF), qui active la voie de STAT3 (79).

La question de savoir si ces deux états de pluripotence peuvent également s'appliquer aux iPSCs, a été récemment soulevée et jusqu'à cette année n'avait pas été investiguée (80). Étant donné qu'il a été démontré que les iPSCs et les ESCs sont équivalentes en termes de pluripotence, si ces 2 états de pluripotence distincts concernent également les iPSCs, il se pourrait que cela puisse engendrer une différence entre les populations d'iPSCs.

1.4.2 Variations parmi les populations d'iPSCs

Le processus de reprogrammation, est un procédé qui entraîne un remaniement intense de la nature de la cellule. Cependant même si son efficacité a été démontrée, l'ensemble des mécanismes menant à bien ce processus restent mécompris. En effet, 3 éléments sont à considérer quant au cheminement qu'emprunte les cellules somatiques vers la pluripotence. Ces trois points sont : 1) l'ordre des étapes cruciales de la reprogrammation, 2) la nature et la redondance des événements moléculaires survenant à chaque reprogrammation ainsi que 3) le temps de traitement de chaque événement moléculaire dépendamment du type somatique d'origine. Ce dernier point joue une importance quant au délai de l'apparition des premières colonies d'iPSCs. Il

a globalement été démontré que concernant l'organisation de la reprogrammation, la phase précoce est considérée comme randomisée quant au modèle d'expression génique, tandis que les événements survenant par la suite sont plus hiérarchisés : il existe une coordination de l'activation graduelle de l'expression des gènes de pluripotence (81). L'ensemble de ces 3 points soulignent que le caractère stochastique du phénomène de reprogrammation.

Ce processus entraîne également une remise à zéro du paysage épigénétique, ce qui provoque un délai dans l'activation des gènes liés à la pluripotence. Des études ont démontré que la rapidité et l'efficacité de la liaison initiale des facteurs de reprogrammation était justement liée à l'accessibilité de la chromatine (82). Ce qui peut engendrer de surcroît une reprogrammation incomplète et peut conduire à des modèles de paysages épigénétiques différents entre les populations iPSCs (83).

Il a été démontré dans la littérature, qu'il existait des variations entre les iPSCs, aussi bien au niveau génétique qu'épigénétique. Ces variations ont été attribuées aussi bien au *background* de la cellule somatique d'origine, de la reprogrammation, qu'à celui du donneur (84, 85).

Les conditions de culture des iPSCs jouent également un grand rôle dans la maintenance des iPSCs. L'environnement de culture est très important pour l'auto-renouvellement et la maintenance de la pluripotence des iPSCs (86). Chaque élément de culture peut avoir un effet sur l'expression génique des iPSCs, ainsi le type de *coating*, le nombre de passage, les composants du milieu de culture, la structure dans laquelle les cellules sont cultivées peuvent apporter une variation sur les populations d'iPSCs (84). En effet, il a été démontré que le statut épigénétique des iPSCs peut varier lorsqu'elles sont cultivées de façon prolongée (84).

1.4.3 Conséquences d'une variabilité inter-populationnelle chez les iPSCs

La qualité des cellules différenciées à partir des iPSCs dépend grandement de l'état de départ de ces dernières. En effet, comme évoqué précédemment (sections 1.4.1 & 1.4.2), de nombreux facteurs jouent sur l'état des iPSCs. Ces différences générées entre les populations d'iPSCs peuvent également être observées durant le processus de différenciation (13). Il a été démontré, que plusieurs populations d'iPSCs ne parvenaient pas à se différencier correctement. De plus, certaines populations d'iPSCs se sont avérées être meilleures que d'autres pour se différencier dans un type cellulaire donné (87).

Ceci a de lourdes conséquences notamment d'une part sur la reproductibilité des expériences, mais également dans le domaine de la thérapie cellulaire (88). En thérapie cellulaire autologue, des cellules somatiques du patient sont prélevées dans le but d'être reprogrammées et corrigées, pour être ensuite différenciées en cellules somatiques et réinjectées chez le patient pour traiter sa maladie. Il est possible que la population d'iPSCs obtenue ne soit pas optimales pour être différenciée dans le type cellulaire désiré, empêchant ainsi leur utilisation pour traiter le patient en question. Il est donc impératif de trouver un moyen de rendre exploitable toutes populations d'iPSCs, ainsi de pouvoir, dans le futur, rendre accessible la thérapie cellulaire à tous les patients.

1.4.4 Mimer le rôle de l'embryogenèse : l'importance de l'endoderme

De nombreuses études ont indiqué que la qualité de l'endoderme avait des répercussions sur les hépatocytes, lorsqu'il est question de différenciation. Ainsi, les différences inter-populationnelles des iPSCs peuvent également s'observer à cette étape de la différenciation. Ceci explique pourquoi il est nécessaire en priorité de mettre l'accent sur cette phase du développement si on souhaite mieux comprendre et obtenir une différenciation efficace et le plus homogène possible (89).

Les iPSCs étant pluripotentes au même titre que les ESCs, elles sont amenées à prendre des décisions qui leur permettront de s'établir en tant que cellule d'un type spécifique. Il est possible d'orienter le choix de ces cellules pluripotentes, par le biais d'une bonne connaissance de la lignée cellulaire d'intérêt, afin de connaître les éléments décisifs nécessaires à chaque étape de l'engagement de la cellule. La différenciation *in vitro*, permet donc de guider les ESCs et iPSCs vers chaque étape décisive qui mène au type cellulaire d'intérêt, en activant et/ou en inhibant progressivement des voies de signalisation d'importance capitale dans l'organogenèse.

Le milieu de culture est très important, car l'environnement cellulaire permet d'exercer le contrôle adéquat sur la prise de décisions des cellules. En effet, le milieu de culture est supplémenté par des facteurs de croissance, des molécules inhibitrices ou activatrices d'origines pharmacologiques ayant une analogie avec ce que l'on retrouve *in vivo* (section 1.3.2). À chaque étape cruciale de l'organogenèse, la composition du milieu de culture est adaptée en conséquence (90).

1.4.5 Principales voies de signalisation impliquées dans la différenciation de l'endoderme

Comme évoqué précédemment, de nombreux protocoles de différenciation vers l'endoderme et ses organes dérivés existent. Ces protocoles, même s'ils n'utilisent pas exactement les mêmes facteurs, ont pour but de récapituler les mêmes étapes de l'embryogenèse afin d'atteindre l'endoderme (section 1.3.2.2). La différenciation *in vitro* en endoderme définitif (DE), se fait généralement pendant 5 jours (même si certains protocoles le font également en 3 jours).

Les iPSCs, sont considérées comme étant des cellules à l'étape de l'épiblaste. Lors de l'embryogenèse *in vivo*, l'épiblaste se différencie en amnioblastes et en cellules épiblastiques intra-embryonnaires qui formeront plus tard la ligne primitive (section 1.3.2). Les principales voies de signalisation impliquées dans cette étape sont la voie Activine/Nodal, ainsi que la voie du WNT/Beta-Caténine, connue pour initier la

formation de la ligne primitive *in vitro*, ainsi que permettre la poursuite de la différenciation des cellules de la ligne primitive. Ces voies de signalisations s'activent mutuellement et jouent un rôle double : elles sont, en effet, impliquées dans le maintien de l'état de pluripotence de l'épiblaste, aussi bien que dans la différenciation.

In vitro, l'Activine A se lie au même récepteur que le Nodal. Elle se fixe sur les récepteurs de la voie Nodal, ce qui permet la phosphorylation de SMAD2/3. SMAD2/3 phosphorylé va par la suite former un complexe avec SMAD4 et se rendre dans le noyau afin d'induire l'expression des gènes liés à la différenciation (**Figure 10**) (91).

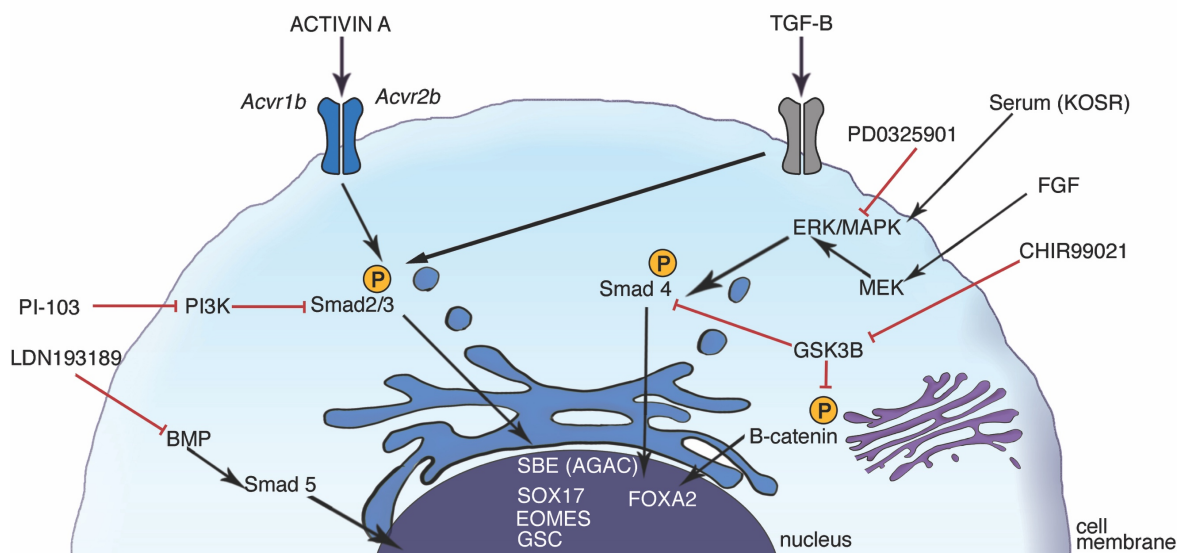


Figure 10 : Impact des petites molécules & facteurs de croissance sur la différenciation en endoderme

Lorsque l'Activine A est maintenue à forte concentration (100 ng/mL) pendant 5 jours, cela mène à la formation du DE. Ces deux voies sont connues pour induire de manière synergique l'endoderme définitif, cependant l'Activine A seule suffit à induire l'établissement du DE. Néanmoins, il a été démontré que la combinaison à l'Activine A de petites molécules comme le CHIR99021 permettait de potentialiser la voie du Nodal/Activine A (92). En effet, afin d'induire la différenciation en endoderme, une inhibition de GSK3, est souvent utilisée. Cette voie permet d'augmenter l'accumulation nucléaire de β -Caténine et la maintenance de la pluripotence. Le CHIR99021 est un inhibiteur de GSK3 communément utilisé pour cette différenciation.

Dans un premier temps, les gènes associés à la ligne primitive antérieure tels que *FOXA2* principalement vont s'exprimer. Au jour 3 de la différenciation, il y a notamment une régulation à la hausse des gènes cibles de la voie du Nodal tels que *BRACHYURY (T)*, *EOMES*, *MIXL1*. *Brachyury (T)*, est marqueur précoce de la gastrulation. *T* interagit avec *SMAD2/3* (voie du Nodal) et *EOMES* afin d'activer l'expression des gènes de l'endoderme (93). *Eomesodermine (EOMES)*, est connu pour marquer le début de la spécification de l'endoderme. L'expression de *EOMES* est initiée par *NANOG*, à son tour *EOMES* va interagir avec *SMAD2/3* pour induire la transcription des autres facteurs reliés à l'endoderme (94). *MIXL1*, de même interagit également avec *SMAD2/3* en réponse à l'*ACTIVINE A*, pour induire l'expression des gènes de l'endoderme définitif (95).

À la fin de l'induction de l'endoderme définitif, les cellules expriment des facteurs connus pour être hautement exprimés dans l'endoderme définitif tels que *SOX17*, *GATA4*, *CXCR4*, toujours suite à l'influence de l'*Activine A* (96) (**Figure 10**).

SOX17 est indispensable à la formation de l'endoderme définitif, une fois le DE établi, il joue également un rôle actif dans l'organogenèse des dérivés de l'endoderme comme le foie, cependant son mode d'action n'est pas encore très bien connu (97). De façon similaire *GATA4*, est aussi un acteur dans l'organogenèse, mais son rôle est plus étudié au niveau du pancréas (98). *CXCR4*, joue un rôle important quant à la migration des cellules de l'endoderme lors de la gastrulation. En effet, les cellules du mésoderme adjacentes à l'endoderme et qui expriment *Sdf1* dirigent les cellules de l'endoderme *CXCR4*-positive à migrer vers le côté dorsale chez le zébrafish (99).

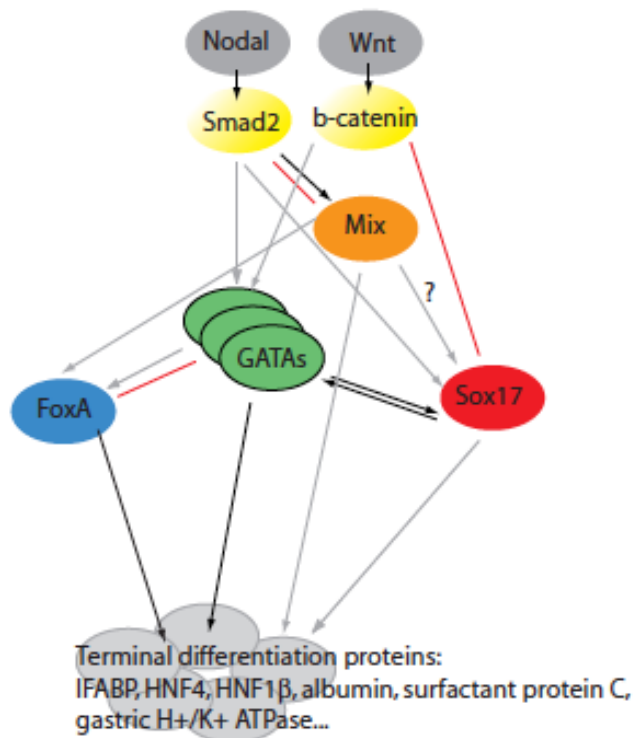


Figure 11 : Principales voies de signalisation impliquée dans l'induction de l'endoderme. (100)

1.4.6 Problématiques et questions liées aux disparités au sein des populations d'iPSCs

Les sections précédentes ont permis de mettre en lumière l'hétérogénéité observée entre les populations d'iPSCs. Suite à cela, il est possible de soulever certaines questions comme la réelle incidence de telles différences sur le potentiel de différenciation des iPSCs. En effet, ces différences influencent la reproductibilité de la différenciation et donc l'utilisation des iPSCs pour la modélisation de maladies ainsi que la thérapie cellulaire autologue. Il est donc impératif de comprendre l'origine de ces disparités, mais également de trouver des solutions afin de les atténuer dans le but d'améliorer la différenciation en hépatocytes. Comme discuté précédemment, la qualité des hépatocytes dépend de la qualité de l'endoderme, raison pour laquelle il tient une place centrale dans ce projet. Il est donc crucial de comprendre ce qui permet à l'endoderme d'être de bonne qualité à partir du stade iPSCs.

1.5 Hypothèses & Objectifs

Basé sur le fait que les iPSCs sont similaires aux ESCs en termes de pluripotence, il serait alors possible d'appliquer les 2 différents états de pluripotence, à savoir les états amorcé et naïf, aux iPSCs également. L'hypothèse est que les différents états de pluripotence, naïf et amorcé pourraient expliquer les différents potentiels de différenciation parmi les populations d'iPSCs.

L'amélioration de la qualité de la différenciation hépatique reposant sur la compréhension de telles disparités, il est donc nécessaire d'en investiguer les causes.

L'objectif principal de ce projet est d'améliorer la qualité de la différenciation *in vitro* en hépatocytes à partir d'iPSCs. Cet objectif se décompose en 2 autres sous-objectifs, à savoir : 1) Déterminer les différences entre les populations d'iPSCs (états de pluripotence) pouvant expliquer les dissemblables potentiels de différenciation, 2) Établir une corrélation entre les états de pluripotence des iPSCs et les stades de l'endoderme et hépatique. En effet, une meilleure compréhension des potentiels de différenciation des iPSCs en endoderme et donc en hépatocytes permettrait ainsi de savoir où et comment agir pour améliorer la qualité de la différenciation.

CHAPITRE II : MATÉRIEL & MÉTHODES

Lignées d'iPSCs

Toutes les lignées de cellules pluripotentes induites ont été reprogrammées en utilisant la méthode de transduction des plasmides par le biais du virus Sendai (Sendai CytoTune 2.0™). Les 3 lignées différentes proviennent de 2 origines somatiques différentes : iPSC-P01 et iPSC-P03 proviennent de cellules périphériques mononuclées du sang (PBMCs) issues de donneurs différents et iPSC-P02 provient de fibroblastes de la peau. À cause du fait que les cellules somatiques d'origines soient des PBMCs ou des fibroblastes, le protocole de reprogrammation diffère. Il est important de préciser que toutes nos expériences ont été réalisées dans des conditions *feeder-free* et *xeno-free*. Les cellules *feeder* d'origine humaine ou de souris sont communément utilisées avec les cellules pluripotentes afin d'aider à maintenir cette pluripotence par l'apport de plusieurs facteurs méconnus. Néanmoins l'utilisation de *feeder* pourrait favoriser des contaminations entre animaux et humains, raison pour laquelle en vue d'éventuels essais cliniques, nous ne les utilisons pas dans nos cultures cellulaires. De même, l'emploi de conditions *xeno-free*, c'est-à-dire l'utilisation de produits ne contenant pas de dérivés d'origine animale, est essentiel pour les mêmes raisons (101).

Reprogrammation

Plasmides utilisés. Les 3 plasmides utilisés pour reprogrammer les cellules somatiques sont : cMyc, Klf4 et le polycistronique Klf4-Oct3/4-Sox2. Ces facteurs sont connus pour jouer un rôle clé dans l'induction de la pluripotence : Sox2 et Oct3/4 permettent le maintien de la pluripotence. Klf4 et cMyc sont connus pour permettre le maintien du phénotype des ESCs, ainsi que de permettre leur rapide prolifération. Ces plasmides induisent la surexpression de facteurs de pluripotence clés, afin de permettre la reprogrammation des cellules somatiques adultes.

Reprogrammation des cellules périphériques mononuclées sanguines (PBMCs).

Isolation des PBMCs. Le sang a été collecté directement dans des tubes Vacutainer® CPT™ avec 8 mL de sodium héparine. Les tubes Vacutainer® CPT™ ont été stockés à température ambiante, mais pas plus de 4 h (h), dans le cas où ils n'étaient pas utilisés directement. Les tubes BD Vacutainer® CPT™ ont été centrifugés à 1 800 g (2800 rpm) à température ambiante pendant 20 min (min). Après centrifugation, en utilisant une pipette de 5mL, le plasma a été doucement mélangé en pipetant de haut en bas contre le tube dans le but de déloger les cellules pouvant être coincées. La suspension cellulaire a ensuite été transférée dans un tube Falcon™ de 50 mL en combinant les cellules de chaque tube, si nécessaire. Un milieu sans sérum, le StemPro-34®, a été ajouté à un volume total de 40 mL. Un aliquot de 10 µL de la suspension a été prélevé pour le comptage de cellules (hépatocymètre ou compteur de cellules automatique) et pour déterminer la viabilité cellulaire (en utilisant la méthode d'exclusion du Bleu de Trypan™). La suspension cellulaire a été centrifugée à 250g (1 200 rpm) pendant 7 min à température pièce. Les cellules centrifugées ont ensuite été re-suspendues à une concentration de 5×10^6 cellules viables/mL dans le milieu StemPro-34® complet, ou de manière optionnelle, cryo-préservées.

Reprogrammation des PBMCs. Quatre jours avant la reprogrammation, les PBMCs fraîches ou décongelées ont été re-suspendues dans du milieu StemPro-34® complet (cStemPro-34®) supplémentées avec des cytokines (SCF, FLT3, IL3, IL6) à 5×10^5 cellules/mLensemencées et incubées à 37°C et à 5% CO₂. Le jour de la reprogrammation des PBMCs, les cellules ont été comptées et traduites avec le virus Sendai CytoTune 2.0™ (d'après les instructions du manufacturier). Plus spécifiquement, les cellules ont été comptées et le volume de chaque virus nécessaire pour atteindre la multiplicité d'infection (MOI) cible et l'information de titre sur le certificat d'authenticité (CoA) a été déterminée comme il suit :

$$\text{Volume virus } (\mu\text{l}) = \text{MOI (unité de cellules infectieuses ou CIU/cellule)} \times \text{n}^{\circ} \text{ de cellules / titre de virus (CIU/mL)} \times 10^{-3} (\mu\text{l/mL})$$

Les cellules ont été récoltées et distribuées dans des plaques de 6 puits avec $2,5-5 \times 10^5$ cellules/puits pour la transduction. Les volumes calculés de chacun des 3 tubes Sendai CytoTune 2.0™ ont été ajoutés à 1 mL de milieu cStemPro-34™ pré-chauffé à 37°C. Le mélange a été doucement mélangé en pipetant de haut en bas. Les bords de la plaque ont été scellés avec du Parafilm™ et centrifugés à 2 250 *rpm* pendant 90 min à température ambiante. Une addition de 1 mL de milieu cStemPro-34™ a été appliquée à chaque puits et les cellules ont été incubées pendant la nuit. Le jour suivant, les cellules et le milieu ont été retirés de la plaque de culture et transférés dans un tube de 15 mL. Les cellules ont été doucement rincées avec 1 mL de milieu cStemPro-34™ afin de s'assurer que la plupart des cellules ont été récupérées. La suspension cellulaire a été centrifugée à 1 200 *rpm* pendant 10 min. Le surnageant a été éliminé et les cellules ont été re-suspendues dans 0,5 mL de milieu cStemPro-34™ par puits de la plaque de 6 puits. Les cellules ont été cultivées à 37°C et 5%CO₂ dans l'air pendant 2 jours. Trois jours après la reprogrammation, les cellules ont été placées sur des plats de culture tapissés avec de la vitronectine ou de la laminine, 10 000 et 50 000 cellules vivantes par récipient de culture avec du milieu cStemPro-34™ sans cytokines. Sept jours après la reprogrammation, les cellules ont été transférées vers un milieu d'iPSCs (Essentiel 8 Flex medium, premièrement avec un ratio 1 :1 avec du milieu cStemPro-34™, puis après dans du milieu Essentiel 8 Flex™). Les colonies (e.g agrégats de cellules) apparaissent généralement 15-21 jours après la reprogrammation. Les colonies reprogrammées ont été identifiées et sélectionnées pour piquage après une coloration du marqueur cellulaire membranaire TRA1-60. En détails, les cellules ont été lavées avec du PBS chaud puis incubées avec un anticorps anti humain TRA1-60 conjugués avec FITC (dilué 1 :100 dans du milieu Essentiel 8 Flex et filtré en utilisant une seringue avec un filtre composé d'une membrane SFCA, 0,2 µm) pendant 1h à 37°C. Après l'incubation, les cellules ont été lavées avec du milieu Essentiel 8 Flex et examinées sous un microscope fluorescent. Les colonies reprogrammées avec succès ont été marquées et piquées manuellement pour une expansion sur des plaques tapissées de vitronectine. Les colonies piquées ont été

cultivées sur des plaques de culture tapissées de vitronectine dans du milieu complet d'Essentiel 8 Flex TM à 37°C dans 4%O₂ et 5%CO₂ dans l'air. Les colonies de cellules ont été laissées pendant 24h afin qu'elles puissent s'attacher avant de changer le milieu chaque jour. Les iPSCs ont été cultivées dans du milieu Essentiel 8 Flex et dans des récipients de culture tapissés de vitronectine avec un changement de milieu au quotidien.

Reprogrammation des fibroblastes de peau. Deux jours avant la transduction, les cellules fibroblastiques ont été mises en culture dans une plaque de 6 puits à une densité appropriée afin d'atteindre entre 2 x 10⁵ - 3x10⁵ cellules par puits le jour de la transduction dans le milieu de culture des fibroblastes (DMEM avec un haut niveau de glucose). Le jour de la reprogrammation, les cellules fibroblastiques ont été comptées et traduites avec le virus Sendai CytoTune 2.0TM (d'après les instructions du fabricant). Plus spécifiquement, les cellules ont été comptées ainsi que le volume de chaque virus nécessaire afin d'atteindre la multiplicité d'infection cible et l'information de titre sur le CoA ont été déterminés comme il suit :

$$\text{Volume virus } (\mu\text{l}) = \text{MOI (unité de cellules infectieuses ou CIU/cell)} \times \text{n}^{\circ} \text{ de cellules} / \text{titre de virus (CIU/mL)} \times 10^{-3}(\mu\text{l/mL})$$

Les cellules ont été récoltées etensemencées dans une plaque 6 puits avec 2,5-5 X 10⁵ cellules/puits pour la transduction. Le volume calculé pour chacun des 3 tubes Sendai CytoTune 2.0TM ont été ajouté à 1 mL de milieu de culture pour fibroblaste pré-chauffé à 37°C. Le mélange a été doucement mélangé en pipetant de haut en bas. Une addition de 1 mL de milieu de culture pour fibroblastes a été ajoutée à chaque puits et les cellules ont été incubées pendant la nuit. Le jour après la reprogrammation, les cellules fibroblastiques ont été passées et 5 X 10⁵ cellules ont été placées dans des récipients de culture couverts de vitronectine (Pétri de 100 mm). Huit jours après la reprogrammation, les cellules ont été placées dans du milieu de culture Essentiel 8

Flex™. Les colonies apparaissent en général 15-21 jours après la reprogrammation. La sélection des colonies reprogrammées a été faite grâce à une coloration live, voir la procédure décrite au-dessus pour la reprogrammation des PBMCs. Les colonies de cellules ont été piquées manuellement et transférées dans des récipients recouverts de vitronectine ou de laminine. Après la reprogrammation, des iPSCs obtenues de qualité clinique, c'est à dire sans intégration du virus Sendai et maintenues dans des conditions *xeno-free* et *feeder-free*. Ces iPSCs ont acquis la capacité d'auto-renouvellement et des niveaux d'expression de gènes de pluripotence typiques des cellules souches pluripotentes, tout en montrant un haut niveau d'homogénéité parmi la population à l'analyse par cellule unique (de l'anglais « *single cell level* »).

Culture cellulaire.

Maintenance des iPSCs. Les cellules iPSCs ont été maintenues dans des pétris de 100mm recouverts de vitronectine et comme milieu de culture Essentiel 8 Flex (A2858501, ThermoFisher). Une fois les cellules ayant atteint environ 75% de confluence, les iPSCs ont été passées avec une dilution de 1/10. Le passage des iPSCs s'effectue en utilisant du DPBS sans calcium et magnésium contenant de l'EDTA. Avant chaque passage, le milieu de culture est retiré, puis la pétri est rincé avec du DPBS sans calcium et magnésium, puis le DPBS contenant de l'EDTA est ajouté (environ 7mL par pétri), un temps d'attente de 7min à température ambiante est nécessaire, puis le DPBS avec EDTA est retiré. Environ 10 mL de milieu Essentiel 8 Flex est alors ajouté, puis les colonies sont décollées à l'aide d'une pipette.

Passage en cellules unique (de l'anglais « *single cell passaging* »). Avant de débiter une différenciation, les cellules iPS sont dissociées de leur colonie avant d'être passées. Cette étape est cruciale afin que l'ensemble des cellules puissent entrer en contact de manière plus homogène avec les éléments présents dans le milieu de différenciation. Pour ce faire, de l'Accutase™ est utilisée à la place du DPBS avec EDTA pour détacher les cellules. Chaque pétri est d'abord rincée avec du DPBS sans calcium/magnésium, puis environ 5 mL d'accutase est ajouté. Un temps d'attente de

5 min à 37°C est nécessaire afin de permettre le détachement des cellules. Par la suite, 5 mL d'Essentiel 8 Flex contenant du Revita Cell (ThermoFisher, A2644501) est directement ajouté à l'Accutase. Les cellules sont ensuite détachées à l'aide d'une pipette puis l'ensemble du milieu est récupéré dans un tube Falcon de 15mL. Une centrifugation à 1200 g pendant 5 min est nécessaire puis le surnageant est écarté et le culot contenant les cellules, est re-suspendu dans de l'Essentiel 8 Flex contenant du Revita Cell TM.

Les cellules sont ensuite déposées dans des puits recouverts avec de la laminine 521 (BioLamina, LN-521) à la concentration désirée.

Différenciation

Optimisation du protocole – Conditions testées. AFC (ACTIVIN A, FGFb, CHIR99021) fait référence au protocole standard de Si-Tayeb (2010). À partir de ce protocole, nous avons essayé d'ajouter 1% de knock-out serum replacement (KOSR) dans le but d'améliorer la survie cellulaire au cours de la différenciation. De plus, nous avons également testé différents types de recouvrements à savoir : la laminine 521, la vitronectine, et un mélange de laminine 521 et laminine 111. Nous avons également essayé d'enlever le FGFb, de réduire l'ACTIVINE A à 25 ng/mL au lieu de 100 ng/mL combiné avec 1% de KOSR.

De même, nous avons pris un autre protocole publié, celui de K.M. Loh (2014)(102), sous le nom de ACP (Activine A, CHIR99021, Pi-103) que nous avons considéré comme un autre protocole standard. À partir de ce protocole, nous avons testés les 3 différents types de recouvrements cités ci-dessus, l'ajout de 1% de KOSR, le retrait de la petite molécule LDN193189, un inhibiteur de BMP, et l'ajout d'une autre petite molécule PD0325901, un inhibiteur de la voie de signalisation MEK. Néanmoins, nous nous sommes focalisés sur l'ajout de KOSR 1%, et l'usage de la lamine 521 comme recouvrement. La laminine 521, s'est avérée plus efficace car elle est connue pour se trouver au niveau des cellules progénitrices hépatiques. La laminine-521 supporte la spécification hépatique, ce qui est bénéfique pour la différenciation (103).

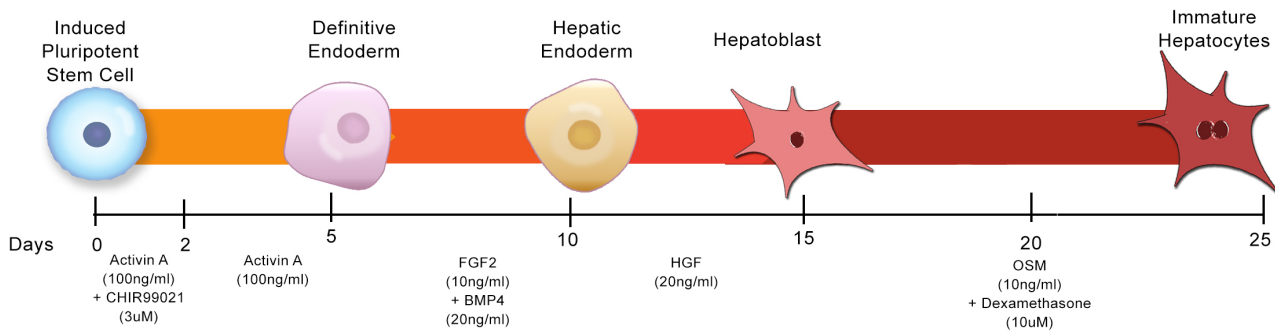


Figure 1 : Récapitulatif du protocole de différenciation en hépatocytes à partir d'iPSCs (modifié à partir du protocole de Si-Tayeb (104))

Différenciation des iPSCs en endoderme. Trois jours avant la différenciation, un passage à cellules uniques avec de l'AccutaseTM a été réalisé et les cellules ont été ensemencées dans des plaques recouvertes de laminine (laminine-521 humaine recombinantes). Les cellules ont été cultivées dans du milieu de culture Essentiel 8 FlexTM, supplémenté avec du Revita CellTM, reconnu pour favoriser la survie cellulaire, pour les premières 24h suivant le dépôt des cellules. Les cellules ont été placées à 37°C dans de l'oxygène ambiant O₂/5%CO₂ pendant la nuit avant de débuter la différenciation. Afin de promouvoir la spécification de l'endoderme (à Jour 1 et 2), les cellules ont été lavées avec du DMEM/F-12 et ont été cultivées avec du RPMI/B27 (sans insuline) supplémenté avec 1% de *knockout serum replacement*, 100 ng/mL d'ACTIVINE A et 3 µM de CHIR99021. Les cellules ont été cultivées pendant 2 jours à 37°C dans de l'oxygène ambiant 21% O₂ et 5%CO₂ dans l'air. Afin de promouvoir l'engagement vers l'endoderme (endoderme définitif, de jour 3 à 5), les cellules ont été lavées avec du milieu DMEM/F-12 et ont été incubées dans du RPMI/B27 (sans insuline) supplémenté avec 100 ng/mL d'ACTIVINE A. Les cellules ont été cultivées pendant 3 jours à 37°C dans de l'oxygène ambiant O₂/5%CO₂ (Figure 1).

Différenciation de l'endoderme en cellules hépatiques (iHeps). Afin de promouvoir la spécification hépatique (la formation des hépatoblastes), les cellules ont été cultivées pendant 2 jours dans du milieu RPMI/B27 (avec insuline, jouant un rôle dans le

développement hépatique à la mi-gestation) supplémenté avec 2% de *knock-out serum replacement*, 20 ng/mL BMP4 et 10 ng/mL FGFb. Pour promouvoir la première étape de la maturation hépatique (e.g formation d'hépatocytes immatures), les cellules ont été lavées avec du milieu DMEM/F-12 et cultivées pendant 5 jours dans du milieu RPMI/B27 (avec insuline) supplémenté avec 2% de knock-out serum replacement et 20 ng/mL de HGF. Dans le but de favoriser la seconde étape de la maturation hépatique (e.g., formation d'hépatocytes matures), les cellules ont été lavées avec du milieu DMEM/F-12 et ont été cultivées pendant 10 jours dans du milieu William E supplémenté avec du supplément de maintenance d'hépatocytes primaires, 20 ng/mL d'OSM et 10 μ M de dexaméthasone (voir section 1.3.2.5) (**Figure 1**). Avec la différenciation 2D, les cellules endodermales acquièrent des marqueurs typiques à la fois des hépatocytes immatures et matures, les cellules sont également capables d'avoir des fonctions uniques des hépatocytes matures (tels que la sécrétion d'albumine, la synthèse de l'urée, et l'activité du cytochrome P450 3A4).

Traitement avec ELABELA. ELABELA est une hormone-peptide qui promeut l'auto-renouvellement des ESCs et favorise la différenciation en mésendoderme.

Les iPSCs ont été traitées avec ELABELA (ELA-32 (humain), Tocris, #6291) à 5 μ M dans le milieu Essentiel 8 Flex de base, sans ajout de petites molécules ou cytokines, pendant 24h, avant de procéder à la différenciation en endoderme.

Immunofluorescence. Les cellules ont été fixées dans du paraformaldéhyde 4% puis perméabilisées dans du Triton XTM-100 pendant 5 min à température ambiante. Les sites non spécifiques ont été bloqués en incubant les cellules avec une solution de sérum bloquant de 3% (correspondant à l'anticorps primaire) à température ambiante. Fixées et perméabilisées, les cellules ont été incubées avec une solution d'anticorps primaire (les anticorps sont dilués dans du PBS-BSA 2%) pour 1h à température ambiante. Les cellules ont ensuite été incubées avec une solution d'anticorps secondaire (fluorescent) pendant 30 min à température ambiante et protégées de la lumière. Pendant les 15 dernières min, un colorant (PureblueTM colorant de noyau,

BioRad) a été ajouté pour colorer le noyau. Les cellules ont été montées avec un réactif Antifade™ (ProLong Gold). La fluorescence a été analysée le jour suivant la procédure.

Liste des anticorps utilisés pour l'immunofluorescence sur les cellules. Anti-humain NANOG dilution 1:10 - Novus Biological; anti-humain TRA1-81 dilution 1:50 - Fisher Scientific; anti-humain SSEA4 dilution 1:50 - Fisher Scientific ; anti-humain POU5F1 dilution 1:50 - Novus Biological; anti-humain SOX2 dilution 1:50 - Novus Biological; anti-humain FOXA2 dilution 1:100 - ABCAM; anti-humain SOX17 dilution 1:100 - ABCAM; anti-humain CXCR4 dilution 1:100 - ABCAM; anti-humain GATA4 dilution 1:50 - ABCAM; anti-humain AFP dilution 1:100 - DAKO; anti-humain Albumin dilution 1:100 - DAKO; anti-humain E-Cadherin dilution 1:100 - BD Bioscience

Analyse de cytométrie en flux

Aux stades des iPSCs et de l'endoderme, l'homogénéité de la différenciation est mesurée. Afin de détacher les cellules, de l'Accutase™ est utilisée comme mentionné précédemment. Les cellules sont comptées par le biais d'un compteur de cellules. Dans chaque tube, environ 1mL de buffer d'incubation (DPBS-BSA) est déposé. 0,5-1 X10⁶ de cellules par tube sont déposées et utilisées pour chaque marqueur ou combinaison de marqueur. Une première centrifugation est effectuée à 800g pendant 5 min afin de laver une première fois les cellules. Le surnageant est retiré puis l'incubation pour les anticorps membranaires est effectuée : 100µL de tampon d'incubation contenant les anticorps (antigène membranaire) d'intérêts à une concentration optimale est employée, pendant 20 min protégé de la lumière. Après la première incubation 1mL de buffer d'incubation est ajouté, puis une centrifugation à 400g pendant 5 min est effectuée. Le surnageant est retiré puis le culot de cellule est vortexé afin de détacher les cellules. Les cellules ont ensuite été fixées avec du paraformaldéhyde pendant 10 min à température ambiante. Après cette incubation, 1mL de buffer d'incubation (DPBS -1% de Triton X™ – 100) est ajouté dans chaque tube, puis centrifugé. Le surnageant est retiré puis la même étape est répétée. Par la suite, l'incubation pour les anticorps cytoplasmiques a lieu avec 100µL de buffer de

perméabilisation contenant les anticorps à une concentration optimale (antigène intracellulaire), pendant 20 min à température ambiante et protégé de la lumière. Après cette incubation, 1mL de buffer de perméabilisation est ajouté, puis une centrifugation à 400g pendant 5 min a lieu. Cette étape est répétée 2 fois. Puis le culot est re-suspendu dans 500µL de buffer d'incubation et conservé à 4°C jusqu'à l'analyse.

Liste des anticorps utilisés pour le FACS. (Provenant de BD Bioscience) : PE anti-humain SSEA4; Alexa 647 anti-humain NANOG; PERCP-CY 5,5 anti-humain TRA1-81; APC-R700 anti-humain.

Mesure de la prolifération

Chaque population a été déposée à une concentration de 200 000 cellules/puits dans une plaque de 24 puits recouverts avec de la laminine 521. La prolifération a été mesurée sur une durée de 7 jours en utilisant le kit de mesure de prolifération avec le BrdU de Abcam.

À chaque *timepoint* (Jour 1, Jour 3 et Jour 7), les cellules ont été incubées pendant 2H à 37°C avec du Bromo-desoxy-uridine (BrdU). Les cellules ont ensuite été fixées (200 µL/puits) avec une solution fournie avec le kit pendant 30 min. Chaque puits a ensuite été rincé avec une solution de lavage fournie avec le kit. Une solution de détection contenant un anticorps anti-BrdU a ensuite été ajoutée pour une incubation de 1h à température ambiante. Après une étape de lavage, une solution contenant un anticorps peroxidase de chèvre anti-souris a été ajoutée pour une incubation de 30 min à température ambiante (toujours fournie avec le kit). Après une étape de lavage supplémentaire, une solution contenant le substrat de peroxidase a été ajoutée pour une incubation de 30 min dans le noir à température ambiante. À cette étape, une couleur bleue apparaît suite à la réaction : la couleur est proportionnelle à l'incorporation du BrdU dans les cellules. Afin d'arrêter la réaction, une solution d'arrêt est ajoutée dans chaque puits, et l'absorbance est lue à 450/550 nm de longueur d'onde.

Extraction d'ARN

Afin d'extraire l'ARN des cellules à différentes étapes de la différenciation, des culots secs ont été réalisés : les cellules ont été décollées à l'aide de l'Accutase™, comme évoqué précédemment. Après un lavage avec du DPBS, puis une centrifugation à pleine vitesse pendant 5 min, le surnageant est retiré et le culot est plongé directement dans de l'azote liquide puis conservés à -80°C.

Les extractions d'ARN ont été réalisées avec le kit de Promega : ReliaPrep™ RNA Cell Miniprep System. Toutes les solutions utilisées sont fournies avec le Kit. Les culots secs sont conservés sur de la glace sèche jusqu'à la première étape de l'extraction. Dépendamment de la taille de culot un volume compris entre 100 et 500µL de buffer BL+TG buffer est ajouté directement au culot avant d'être décongelé. Le culot est ensuite défait en vortexant pendant 30 secondes puis le lysat est passé 5 fois au travers d'une seringue 27G. Un volume d'isopropanol compris entre 35 et 170µL correspondant au volume de buffer BL+TG est ajouté. Le tube est ensuite vortexé pendant 30 secondes. Le lysat cellulaire est ensuite transféré dans une mini-colonne munie d'un tube de collection. Une centrifugation à 12000g pendant 30 secondes a ensuite lieu. Le liquide est mis de côté et 500µL de solution de lavage d'ARN est ajouté à la colonne qui est ensuite recentrifugée. Par la suite, 30µL d'un mélange d'incubation de DNase composé d'un buffer jaune (de l'anglais « *Yellow Core Buffer* »), de DNase I et de MnCl² à 0,09M est ajouté à la colonne pendant 15 min à température ambiante. Après l'incubation, un buffer de lavage de colonne est directement ajouté au mélange d'incubation, puis une centrifugation à 1 200 g pendant 15 secondes a lieu. La colonne est ensuite rincée avec 500µL de solution de lavage d'ARN, suivie d'une autre centrifugation pendant 30 secondes. À chaque étape le tube de collection est vidé. Cette étape est répétée une fois supplémentaire. Par la suite, la colonne est centrifugée à pleine vitesse à sec pendant 1 min. Trente microlitres d'eau (30µL) sans nucléase est ajoutée directement à la colonne pour l'élution, suivi d'une centrifugation à pleine vitesse pendant 1 min.

cDNA – Reverse transcriptase PCR

Pour obtenir du cDNA à partir de l'ARN extrait, le kit Omniscript RT de QIAGEN a été utilisé, toutes les solutions énumérées sont fournies avec le kit. L'inhibiteur d'ARNase est dilué avec de l'eau sans RNase à 1/4 avant d'être utilisée. Chaque mélange pour une réaction est préparé dans des tubes à PCR, pour une réaction sont ajoutés dans l'ordre : 2µL de Buffer RT (concentré 10X), 2µL de mélange dNTP (à 5 mM), 2µL d'Oligo-dT (à 10µM), 1µL d'inhibiteur d'ARN (diluée à 10 unités/µL), 1µL d'Ominiscript Reverse Transcriptase (à 4 unités/µL), 2 000 ng d'ARN (contenu dans un volume maximum de 12µL) et de l'eau sans ARNase si besoin. Chaque réaction est d'un volume maximal de 20 µL. La réaction est ensuite placée dans une machine PCR à 37°C pendant 1h.

Purification du cDNA. Après la transcriptase inverse, le cDNA de chaque échantillon est directement purifié en utilisant le QIAquick® PCR Purification Kit de QIAGEN. Tous les réactifs nécessaires sont fournis avec le kit et ce kit a été utilisé en suivant les instructions du fabricant. Dans un premier temps, 5 volumes du buffer PB ont été ajoutés à un volume du mélange de la réaction de PCR. Afin de lier l'ADN à la colonne, l'ensemble du mélange a ensuite été transféré dans une colonne placée sur un tube de collection fourni avec le kit. La colonne a ensuite été centrifugée pendant 30-60 secondes (sec), et le liquide collecté dans le tube est ensuite éliminé et la colonne replacée sur le tube collecteur. Afin de laver l'ADN, 750 µL de buffer PE est ajouté directement à la colonne, puis le tout est centrifugé pendant 30-60 sec. De même, le liquide recueilli dans le tube collecteur est éliminé. La colonne est ensuite centrifugée à vide afin d'éliminer l'excès de buffer pendant 1 min. Le tube collecteur est ensuite éliminé et la colonne est placée dans un eppendorf de 1,5 mL. Afin d'éluer l'ADN, 50 µL de Buffer EB est ajouté directement au centre de la colonne, puis la colonne est centrifugée pendant 1 min à pleine vitesse. La concentration de cDNA est ensuite déterminée au Nanodrop™.

Real-time RT-PCR. L'ARN total a été extrait (ReliaPrep™ RNA Cell Miniprep System, Promega) à partir des cellules en culture en tant que modèle pour la synthèse de cDNA simple brin. La transcription inverse a été réalisée pour obtenir du cDNA. Le mélange de la réaction PCR a été préparé puis chargé dans la plaque. La plaque a été scellée, centrifugée, puis mise dans l'instrument. Les conditions standard Taqman pour la réaction qPCR ont été utilisées. Les données ont été analysées en utilisant la méthode comparative CT ($\Delta\Delta CT$) pour calculer la quantité relative de l'expression des gènes. La GAPDH a été utilisée comme gène de référence pour toutes les qPCRs.

Liste des sondes Taqman utilisées. (provenant de Thermo Fisher scientific) Hs04399610G1 Nanog Taqman gene expression assay; Hs01895061_U1 POU5F1 Taqman gene expression assay; Hs1053049_S1 SOX2 Taqman gene expression assay; Hs00751752_S1 SOX17 Taqman gene expression assay; Hs00171403_M1 GATA4 Taqman gene expression assay; Hs002230853_M1 HNF4A Taqman gene expression assay; Hs00173490_M1 AFP Taqman gene expression assay. Hs00609411_M1 Albumin Taqman gene expression assay; Hs99999905_M1 GAPDH Taqman gene expression assay. Les résultats montrés représentent une moyenne obtenue après 3 répétitions.

Biomark HD Fluidigm

Pré-Amplification du cDNA avec les probes Delta Gene. Les cDNA pour chacune des conditions testées ont été obtenus avec la méthode décrite ci-dessus. La pré-amplification des cDNAs a été réalisée en suivant les instructions du manufacturier.

Combinaison des probes Delta Gene : Dans un eppendorf, 1 μ L de chacun des probes Delta Gene d'une concentration de 100 μ M a été déposé. Le buffer de suspension d'ADN (10 mM Tris, pH 8.0, 0,1 mM EDTA, TEKnova) a été ajouté afin de ramener le volume à 200 μ L, chacune des probes étant ainsi d'une concentration de 500 nM.

Préparation du mélange de Pré-Amplification : Dans un autre eppendorf, le Preamp Master Mix (Fluidigm PN 100-5580) et les probes Delta Gene préalablement combinés sont mélangés de sorte à avoir un volume pour 96 réactions, ce mélange constitue le mélange de pré-amplification. Dans une plaque de 96 puits, 3,75 μ L du mélange de pré-amplification est ensuite déposé dans chaque puits, suivi 1,25 μ L de cDNA, afin d'obtenir un volume final de 5 μ L. La plaque PCR de 96 puits est ensuite vortexée pendant 5 secondes et centrifugée à 1 000 g pendant 1 min. La plaque PCR a ensuite été placée dans la machine pour 14 cycles d'après les conditions suivantes : Température *Hold* 95°C – 2 min, 95°C – 15 sec, 60°C – 4 min, *Hold* 4°C.

Nettoyage des réactions avec l'exonuclease I : Tout d'abord l'exonuclease (Exo I) a été diluée à 4U/ μ L en utilisant le buffer de réaction correspondant à l'exonuclease I (New England BioLabs, PN MO293S). Dans la plaque de 96 puits utilisée pour la préamplification, 2 μ L d'Exo I a été ajouté à chacune des réactions de 5 μ L. La plaque PCR a ensuite été vortexée pendant 5 sec puis centrifugée pendant 10 sec à 1 000 g. La plaque PCR a ensuite été placée dans la machine avec les conditions suivantes : Digestion : 37°C – 30 min, Inactivation : 80°C – 15 min, *Hold* 4°C.

Par la suite, chacune des réactions digérées a été diluée 5X avec du buffer de suspension d'ADN.

À la fin de cette étape, il est possible de garder la plaque de 96 puits à -20°C pendant 1 semaine, ou dans le cas contraire, il faut passer à l'étape suivante dans un intervalle de 60 min.

Préparation du pré-mélange des échantillons. Dans un nouvel eppendorf, il s'agit de préparer un mélange destiné au traitement des cDNAs pré-amplifiés et traités à l'exonucléase, en combinant 360 μ L de 2X SsoFast EvaGreen Supermix avec ROX bas (BioRAD, PN 172,5211) avec 36 μ L de 20X DNA Binding Dye (Fluidigm, PN 100-7609). Dans une nouvelle plaque PCR, il faut ajouter 3,3 μ L par puits de ce mélange avec 2,7 μ L de cDNA pré-amplifié et traité à l'Exo I, afin d'obtenir un volume final de 6 μ L par puits. À la fin de cette étape, il est possible de conserver la plaque à 4°C pendant

maximum 24h, ou sinon, il faut procéder au chargement des échantillons sur la plaque (« chip ») micro fluidique.

Préparation des Probes Delta Gene. Pour chacune des probes, préparer une concentration stock à 5 μM d'un volume de 50 μL avec les réactifs suivants : 25 μL de 2X Assay Loading Reagent (Fluidigm, PN 100-7611), 22,5 μL de 1X DNA Suspension Buffer (TEKnova, PN T0221), et 2,5 μL du stock de 100 μM de chacune des probes. Avant d'être chargés dans la plaque micro fluidique, les Delta Gene probes doivent être vortexées pendant 20 sec et centrifuger à 1 000 g pour 30 secondes, de même pour la plaque des échantillons.

Préparation de la plaque micro-fluidique. Après avoir injecté le fluide dans les accumulateurs de la plaque afin de l'amorcer, celle-ci est placée dans l'instrument pour que le fluide soit injecté dans micro-chambre à réaction. Une fois que la plaque est amorcée, les cDNAs et les probe Delta Gene peuvent être chargés dans la plaque.

Les échantillons et les DeltaGenes probes sont ensuite chargés dans la plaque microfluidique : 5 μL du mélange des probes Delta Genes et 5 μL du mélange des échantillons.

Methylation – Pyroséquençage

Fait par Lisa-Marie Légault.

Le pyroséquençage a été réalisé comme précédemment décrit **(105)**. L'ADN extrait des cellules a été converti au bisulfite en utilisant le kit EpiTect Fast Bisulfite (Qiagen # 59824) selon le protocole du manufacturier. Les oligopeptides ont été conçus en utilisant le logiciel PyroMark Q24 et utilisés pour l'amplification PCR de l'ADN converti au bisulfite avec HotStar Taq Master Mix (Qiagen #203445) dans un volume final de 50 μL et 50 cycles d'après le protocole du manufacturier. Les séquences amplifiées

ont été séquencées en utilisant le Kit PyroMark Q24 (Qiagen #970802) et le PyroMark Q24 Vacuum Workstation (Qiagen, Valencia, CA, USA) en utilisant le protocole du fabricant.

Activité du Cytochrome P450

L'activité du cytochrome P450 CYP3A4 a été évaluée en utilisant P450-Glo™ de Promega d'après les instructions du fabricant.

À jour 25 de la différenciation en hépatocytes, les cellules sont incubées avec de la luciférine-IPA, 3mM fournie par le Kit diluée à 1 :1000 dans le milieu de culture, pendant 1h, protégée de la lumière. Après l'incubation le surnageant est récolté, puis centrifugé pendant 5 min à 11000g, puis 25µL sont déposés dans une plaque opaque et le même volume de réactif de détection de luciférine est ajouté. Ce mélange est ensuite incubé pendant 20 min, protégé de la lumière. La luminescence est ensuite lue grâce à un luminomètre.

Mesure de la production d'albumine

Tout au long de la différenciation en hépatocytes, le surnageant est récolté aux jours 5, 10, 15 et 25 et est conservé à -20°C. La production d'albumine est mesurée avec le kit Albumin Human ELISA Kit de Abcam. Chaque solution utilisée est fournie par le kit. Une fois décongelé, le surnageant est centrifugé à 3000g pendant 10 min. Une dilution en série de standard est préparée à partir du standard d'albumine de 200ng/mL. Dans une plaque opaque pré-traitée 50µL de surnageant et de standard sont ajoutés et incubés à température ambiante pendant 1h. Après l'incubation, la plaque est lavée avec le buffer de lavage 5 fois. Par la suite, 50µL d'anticorps d'albumine biotinylaté est ajouté à chaque puits pour une incubation pendant 30 min à température ambiante. La plaque est ensuite lavée 5 fois comme précédemment, puis 50µL/puits de conjugué est ajouté pour une incubation de 30 min. Cette étape est également suivie d'une série de lavages. Ensuite, 50µL/puits de substrat chromogène est ajouté et incubé pendant 25 min. À cette étape, il est possible d'observer une couleur bleue proportionnelle à la

quantité d'albumine présente. Le même volume de solution d'arrêt est ajouté puis l'absorbance est lue à 450nm.

Mesure de la synthèse d'urée

Sur les mêmes surnageants récoltés tout au long de la différenciation, la synthèse d'urée a été mesurée en utilisant le kit QuantiChrom Urea Assay kit de BioAssay Systems. Toutes les solutions utilisées ont été fournies avec le kit. Le Kit était fourni d'un réactif A et d'un réactif B qu'il fallait mélanger à un volume égal, contenant un substrat chromogène formant un complexe coloré avec l'urée. Cinquante microlitres de chaque surnageant ont été placés dans une plaque transparente de 96 puits à fond plat, 200µL/puits du mélange des réactifs A et B ont été ajoutés pour une incubation de 50 min. L'absorbance a ensuite été lue à 520nm. Le calcul de la concentration de l'urée a été réalisé suivant cette formule :

$$[\text{Urea}] = \frac{\text{OD}_{\text{SAMPLE}} - \text{OD}_{\text{BLANK}}}{\text{OD}_{\text{STANDARD}} - \text{OD}_{\text{BLANK}}} \times n \times [\text{STD}] \text{ (mg/dL)}$$

Analyse statistique

Toutes les analyses statistiques et graphiques ont été réalisés avec le logiciel Prism GraphPad. À moins qu'il ait été indiqué autrement, toutes les valeurs ont été exprimées comme moyennes \pm SD. La comparaison des moyennes a été effectuée (si n=3) en utilisant One-Way ANOVA ou Test t avec des niveaux de signification indiqués comme il suit : ns : non-significatif, *p \leq 0.05 ; **p \leq 0,01 ; ***p \leq 0,001.

CHAPITRE III : RÉSULTATS

1. *Optimisation du protocole de différenciation*

Dans le but d'améliorer le protocole de différenciation des hépatocytes, nous nous sommes tout d'abord basés sur un protocole largement utilisé et validé, celui publié par Si-Tayeb en 2010 (61) qui a été modifié. À l'origine, il alterne entre hypoxie (4%O₂/5%CO₂) et oxygène ambiant avec 5% CO₂. Nous avons décidé de laisser tout au long de la différenciation les cellules en oxygène ambiant. Autre modification par rapport au protocole d'origine, le *coating*, qui de base était du Matrigel TM, a été remplacé par de la laminine 521 (voir introduction section 1.2.2.1). Nous avons décidé d'utiliser ce protocole modifié comme contrôle et de le comparer à un autre protocole de différenciation validé, à savoir celui de K.M. Loh publié en 2014.

Lors des premiers essais du protocole de différenciation standard en hépatocytes, il y avait, pour la majorité des populations d'iPSCs, une forte mortalité cellulaire de l'ordre de 90% observé par rapport à la confluence (données non montrées), nous avons donc cherché à modifier le protocole de différenciation afin de palier à ce problème. Différentes conditions ont été testées sur une différenciation allant jusqu'au stade de l'endoderme (Jour 5), en faisant varier la présence et de facteurs de croissance (FGF utilisé pour agir en synergie avec l'ACTIVINE A, LDN : inhibiteur de la voie de signalisation MEK utilisé pour réduire le mésoderme), et la concentration de l'ACTIVINE A, ainsi qu'en essayant différents types de recouvrement, et en ajoutant du *knock-out serum replacement* (conditions listées dans Matériel & Méthodes) (**Figure 1-A**).

A

Conditions	iPSC-P02	iPSC-P03	iPSC-P01
AFC Standard	++++	++++	+
ACP Standard	+	++++	-
AFC sans FGF	+	++++	-
ACP sans LDN	+	++++	-
AFC 1% KOSR	++++	++++	++++
ACP 1% KOSR	++++	++++	++++
AFC vitronectine	-	++++	+++
ACP vitronectine	+	++++	+++
AFC laminine 521	+	++++	+
ACP lamine 521	-	++++	+++
ACP Mek inhibiteur	-	++++	-
AFC faible Activine A + 1% KOSR	++++	++++	++++

Légende : ++++ : confluence>90%, +++ 60%, ++ 50%, + <10%, - quelques cellules.

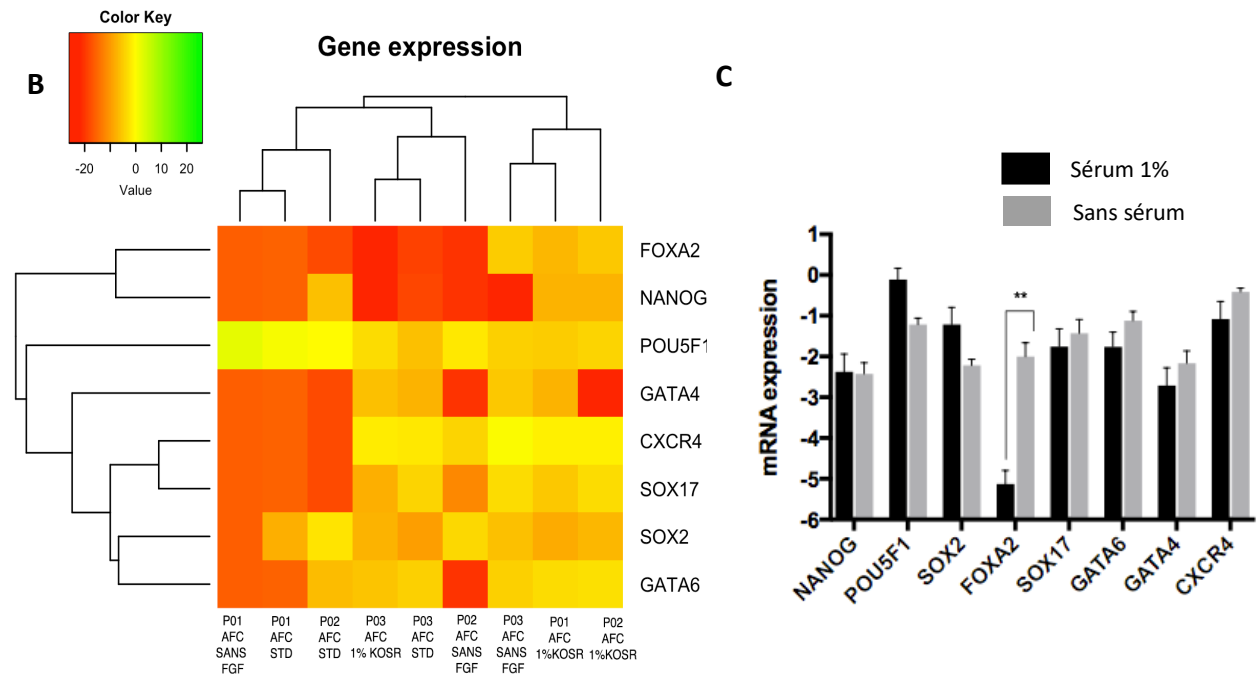


Figure 1 : Optimisation du protocole de différenciation en endoderme : A) Tableau de viabilité des différentes conditions testées B) *HeatMap* pour certains gènes clés de l'endoderme données préliminaires C) Expression des gènes de pluripotence et de l'endoderme en fonction de l'ajout ou pas de knock-out serum replacement (AFP Standard vs AFP 1% KOSR) (n=3, réplicats biologiques P01, P02 et P03, ** p < 0.01 vs sans serum, test t).

Pour ce faire, 3 populations d'iPSCs précédemment caractérisées (iPSC-P01, iPSC-P02 et iPSC-P03) ont été comparées : il est apparu que pour chacune des populations testées, la population iPSC-P03 avait une survie supérieure à 90% (déterminé en fonction de la confluence), tandis que les deux autres atteignaient ce même pourcentage seulement avec l'ajout de *knock-out serum replacement* (KOSR) (Figure 1-A). En effet, la mortalité des iPSCs lors de la différenciation étant un problème majeur, nous avons décidé d'améliorer cet aspect spécifique, ainsi donc, les résultats des autres conditions testées n'ont pas été exploités.

Il s'agissait par la suite de déterminer si l'ajout de KOSR, pouvant régler le problème de mortalité, avait un effet sur l'expression des gènes relatifs à la pluripotence et sur la différenciation en endoderme. Ceci a été déterminé par réaction en chaîne par polymérase après transcription inverse (RT-qPCR) avec la machine Biomark HD (Fluidigm) (voir section Matériel & Méthodes). Cette machine met en scène une plaquette impliquant des valves micro-fluidiques et différentes chaînes qui s'entrecroisent dans le but de mesurer l'expression de 96 gènes sur 96 échantillons différents, ce qui permet d'obtenir 9216 réactions en partant d'une quantité minime d'ARN.

En comparant les conditions avec et sans sérum, à savoir AFP standard comparé à AFP + 1% KOSR et ACP standard comparé à ACP + 1% KOSR (données non montrées pour ACP) par qPCR, il s'est avéré que l'ajout de KOSR, n'altère pas l'expression des gènes clefs nécessaires à l'établissement de l'endoderme. De plus, avec l'apport d'1% de KOSR l'expression de *FOXA2*, gène nécessaire à l'établissement de la ligne primitive, décroît à l'étape de l'endoderme. Ceci indique que les cellules furent plus différenciées que sans sérum (n=3, réplicats biologiques : P01, P02 et P03, ** $p < 0.01$ vs sans sérum). (**Figures 1-B, D**).

Après avoir apporté ces améliorations au protocole de différenciation en endoderme, c'est à dire, en réduisant la mortalité par l'ajout de 1% de sérum (AFP + 1% KOSR) et en améliorant la qualité de différenciation par la réduction de l'expression de *FOXA2*, nous avons comparé ces 3 mêmes populations d'iPSCs en termes de différenciation en hépatocytes.

2. Variabilité de la qualité des hépatocytes différenciés à partir des iPSCs

Les 3 populations d'iPSCs ont donc été différenciées en hépatocytes d'après ce protocole à la Figure 1, section matériel et méthode, mais avec ajout de sérum 1% (condition AFC + 1% KOSR).

Au jour 25 de la différenciation hépatique, les cellules adoptent une morphologie caractéristique des hépatocytes (**Figure 2 A-B**) : à savoir, une forme polygonale (A), la présence de 2 noyaux dans certaines cellules (A), ainsi que la présence de canalicules biliaires, de jonctions serrées, ainsi que de vacuoles cytoplasmiques (A-B).

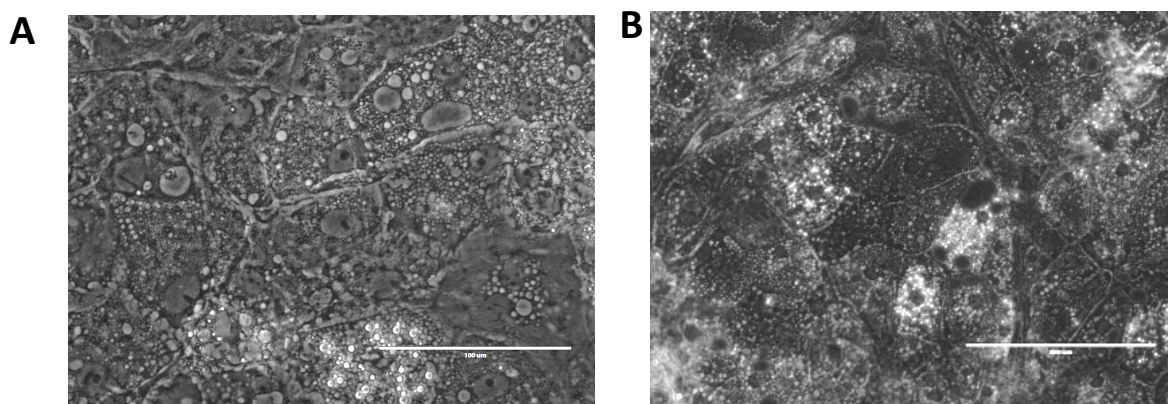


Figure 2 : Morphologie caractéristique des hépatocytes dérivés des iPSCs à J25 de la différenciation (échelle 200 µm, iPSC-P02).

Les niveaux d'expressions de marqueurs hépatiques ont été évalués par RT-qPCR (**Figure 3**). L'alpha-fetoprotéine (*AFP*) est un marqueur hépatique généralement associé avec le développement fœtal du foie, et son expression diminue de façon significative après la naissance. Le fait que les hepatocytes dérivés d'iPSCs (iHEPs) expriment ce marqueur atteste de leur phénotype encore fœtal. L'albumine est la protéine produite par le foie la plus présente dans le sang. Le facteur nucléaire hépatique 4 alpha (*HNF4A*) est un marqueur plutôt caractéristique des hépatoblastes. D'après les résultats issus de cette RT-qPCR, il apparaît que les 3 populations n'expriment pas les mêmes niveaux de marqueurs hépatiques (**Figure 3**).

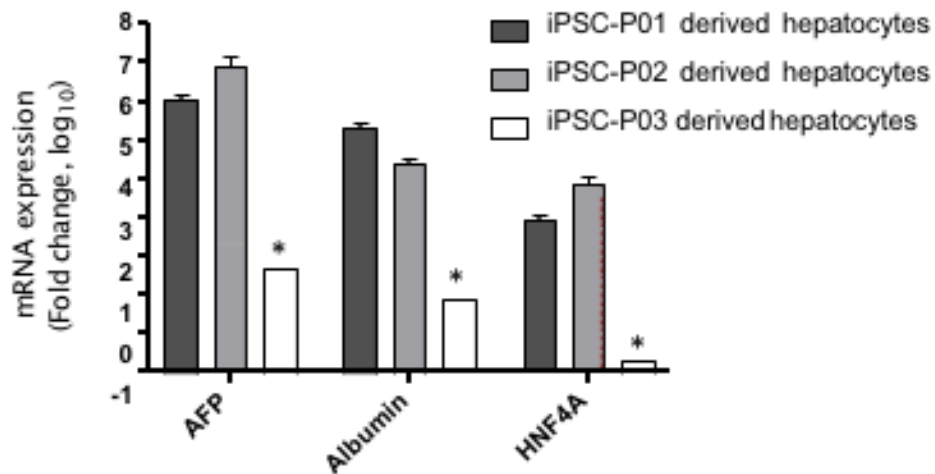


Figure 3 : Expression de marqueurs hépatiques pour les 3 différentes populations à J25 par RT-qPCR (n=3 pour P01 et P02, n=1 pour P03 données préliminaires, * : $p < 0.05$, vs P01, test T).

En effet, iPSC-P03 expriment beaucoup moins d'*AFP*, d'*ALB* et d'*HNF4A* que les deux autres. Cependant, il faut augmenter les n afin de pouvoir déterminer si les résultats obtenus sont vraiment significatifs.

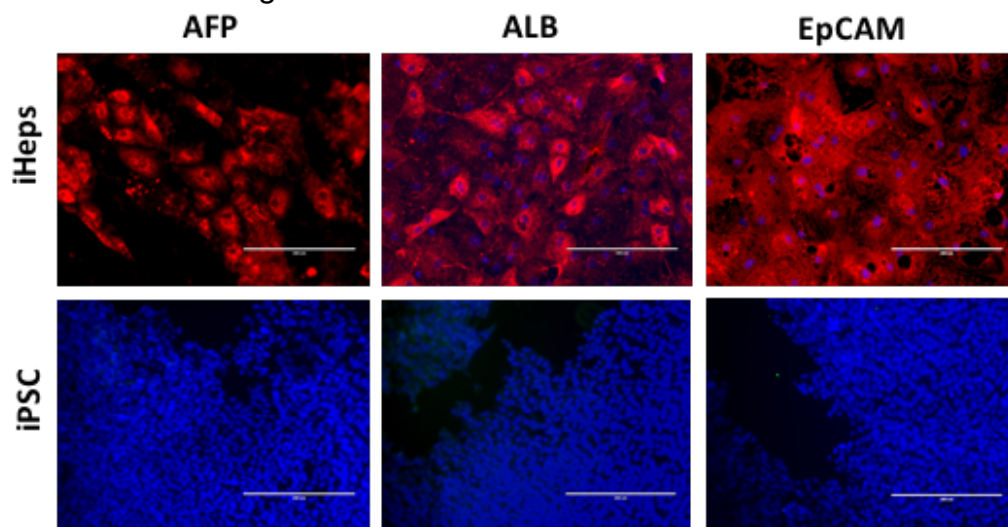


Figure 4 : Détermination de l'expression des marqueurs hépatiques par immunocytochimie en fluorescence pour les 3 populations d'iPSCs (image représentative) (échelle 200 μm , iPSC-P02).

À jour 25 de la différenciation en hépatocytes, une immunocytochimie en fluorescence a été réalisée sur les 3 populations pour les marqueurs hépatiques AFP, ALB et

EPCAM, protéine d'adhésion cellulaire spécifique aux hépatocytes tout juste dérivés de progéniteurs hépatiques. En **Figure 4** est montré une immunocytochimie représentative car il n'y avait pas de différence visible entre les 3 populations.

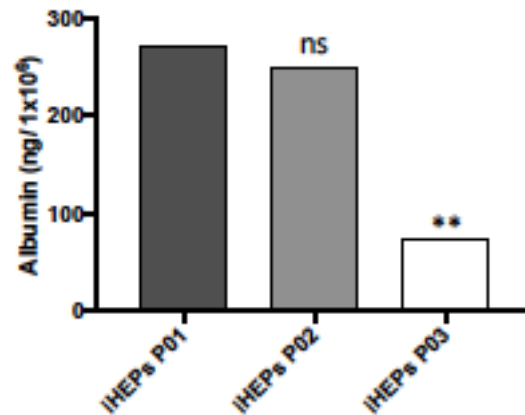


Figure 5 : Mesure de la production d'albumine pour les 3 populations à J25 de la différenciation par ELISA (n=5 pour P01 et P02, n=2 pour P03, ns= non significatif, ** p< 0.01 vs. P01, test t).

Toujours dans l'optique de mieux caractériser les iHEPs du point de vue fonctionnel, la production d'albumine a été mesurée à partir du surnageant à J25 pour chaque population, par méthode immuno-enzymatique ELISA (de l'anglais *enzyme-linked immunosorbent assay*). En accord avec les résultats de RT-qPCR (**Figure 3**), il apparaît qu'il y a une différence entre chaque population : la population iPSC-P03 produit moins d'albumine que les deux autres (**Figure 5**). De même, une augmentation des n pour cette expérience est nécessaire (pour la population P03) afin de déterminer si la différence est réellement significative.

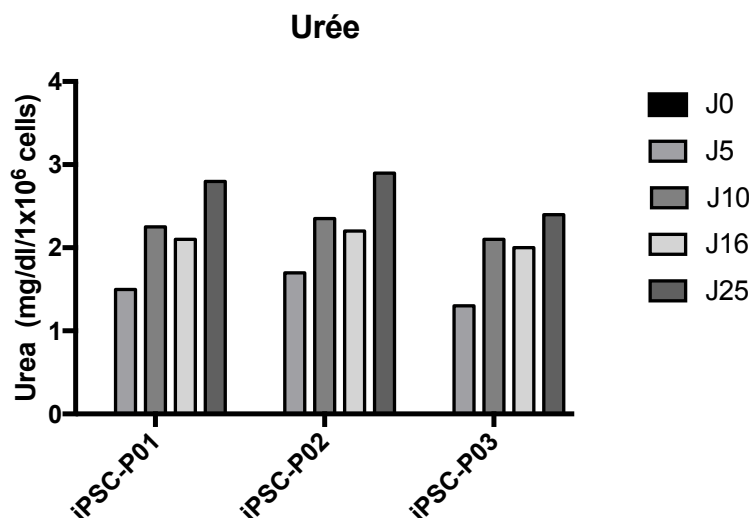


Figure 6 : Mesure de la synthèse d'urée des iHeps à J25 de la différenciation par test colorimétrique (n= 1, données préliminaires).

À partir des surnageants prélevés, la synthèse d'urée (fonction spécifique du foie) a été mesurée par un test colorimétrique *QuantiChrom Urea* de BioAssay Systems. En **Figure 6**, est représenté la synthèse d'urée au cours de la différenciation pour les 3 populations. Globalement, le même schéma est observé pour les 3 populations, cependant il s'agit seulement de données préliminaires, rien ne peut être conclu (n=1).

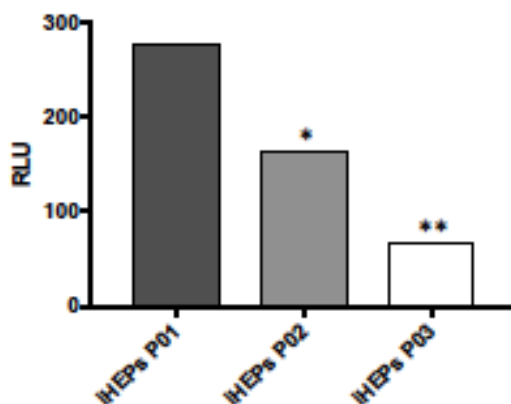


Figure 7 : Mesure de l'activité du cytochrome P450 CYP3A4 pour les 3 populations par luminescence (P-450-Glo CYP3A4 Assay, Promega) (n=3 pour P01 et P02 n=2 pour P03, données préliminaires, * p < 0.05, ** p < 0.01 vs P01, test t, RLU : *relative luminescence unit*).

L'activité du cytochrome P450 (**Figure 7**) avec la production d'albumine (**Figure 5**) permettent d'estimer le niveau de maturation des iHEPs obtenus à la fin de la

différenciation. Le métabolisme des xénobiotiques est en effet une fonction importante assurée par le foie, le CYP3A4 en étant une des enzymes les plus importantes pour assurer cette fonction et le plus tardivement exprimée. La présence de l'activité de cette enzyme atteste de la maturation des hépatocytes. Une différence apparaît entre les 3 populations : la population iPSC-P03 semble avoir une activité du CYP3A4 plus réduite par rapport aux deux autres.

D'après les résultats obtenus suite à la différenciation des 3 populations d'iPSCs en hépatocytes, il semble que globalement, il y ait une variation en termes de capacité de différenciation : la population iPSC-P01 est la meilleure, la population iPSC-P03 semble être la moins bonne et la population iPSC-P02 aurait un potentiel de différenciation en hépatocytes intermédiaire. Cependant, ces résultats sont à confirmer en répétant les expériences.

3. La qualité de l'endoderme détermine la qualité des hépatocytes obtenus à la fin du processus de différenciation

Concernant d'endoderme, il a été mentionné dans la littérature (voir introduction section 1.4.4) que l'endoderme définitif servait d'indicateur quant à la qualité des hépatocytes obtenus à la fin de la différenciation. Basé sur ce fait, nous avons différencié les 3 populations d'iPSCs en endoderme (Jour 5). Nous avons également évalué l'expression de marqueurs de l'endoderme et au niveau protéique, dans le but de voir s'il y avait une corrélation avec ce qui avait été observé chez les hépatocytes obtenus à la fin de la différenciation. Il apparaît qu'il y a une différence au niveau de l'expression de *NANOG* ($p=0,0267$), et aussi de *SOX17*, gène connu pour être hautement exprimé dans l'endoderme définitif, notamment pour la population iPSC-P03 ($p : 0,0477$, (*)) (**Figure 8-A**).

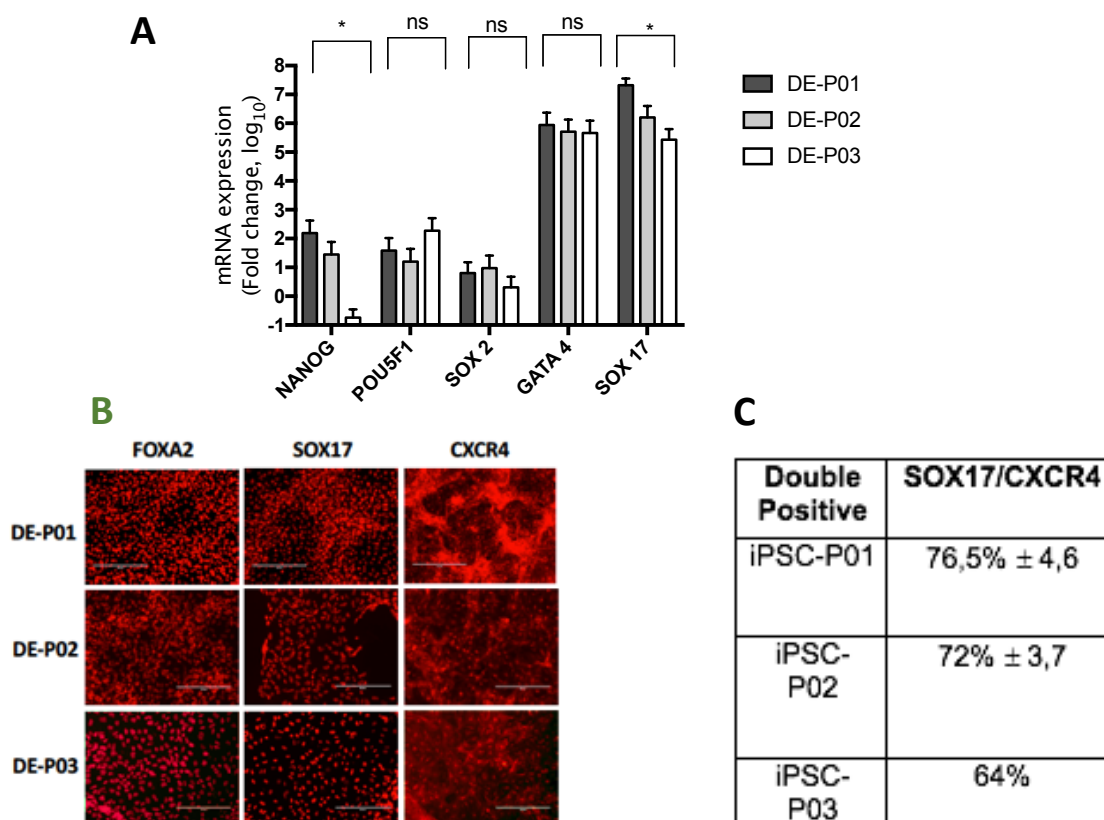


Figure 8 : Caractérisation de l'étape de l'endoderme définitif par RT-qPCR ($n=3$, * $p < 0.05$ vs P01, test t) (A), par immunocytochimie (B) et par analyse de cytométrie en flux ($n=2$ pour P01 et P02, $n=1$ pour P03, données préliminaires) (C)

Nous avons également évalué le niveau protéique des marqueurs de l'endoderme définitif (Figure 8, B-C), notamment avec une analyse de cytométrie en flux, où la population P03 semble moins homogène que les deux autres pour ce qui a trait aux cellules doubles positives SOX17-CXCR4.

Ces résultats permettent de corréler la qualité de l'endoderme et des hépatocytes. En effet, la population P03 paraît avoir plus de difficultés à se différencier que les deux autres, à l'image de ce qui est observable au stade iHEPs, ceci se corréle en effet, à une moins bonne expression des marqueurs clés de l'endoderme comme SOX17, et à une moins bonne homogénéité pour SOX17 et CXCR4, autre marqueur essentiel de l'endoderme. Ces résultats indiquent que des disparités surviennent avant la fin de la différenciation pour les différentes populations d'iPSCs.

4. Différences parmi les populations d'iPSCs pouvant expliquer leur potentiel de différenciation en cellules hépatiques

a. Caractérisation des iPSCs selon les méthodes classiques

Après avoir établi que les trois populations d'iPSCs étudiées possédaient une capacité de différenciation en hépatocytes différente, et que cette différence était déjà évidente au stade de l'endoderme, nous avons comparé les caractéristiques de base de ces populations pour essayer d'identifier les facteurs pouvant expliquer la différence. Les populations iPSC-P01 et P03 proviennent de 2 donneurs différents et sont cependant issues d'un type cellulaire somatique commun : les cellules mononuclées sanguines périphériques (PBMCs). La population iPSC-P02 est, elle, issue de fibroblastes de la peau.

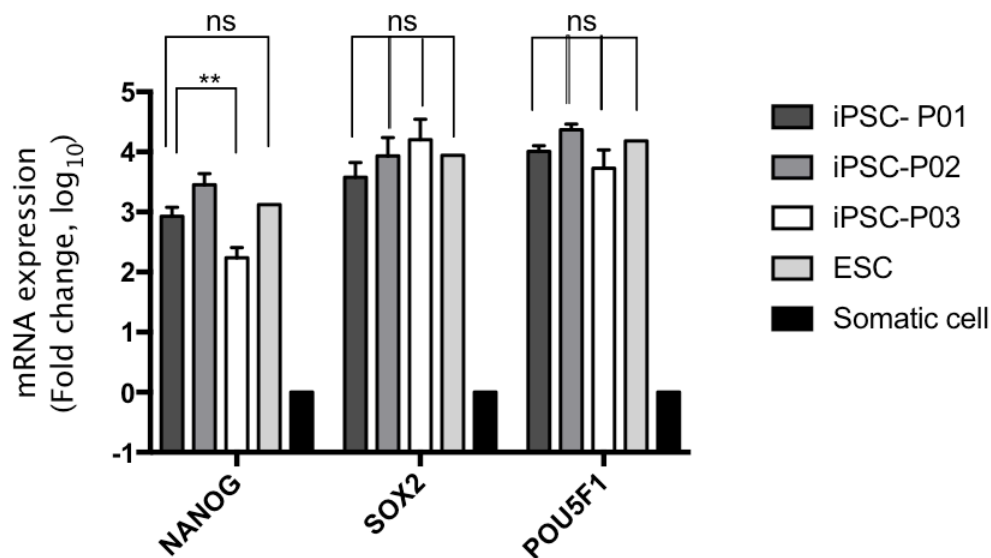


Figure 9 : Expression des marqueurs de pluripotence dans les 3 populations d'iPSCs par RT-qPCR (n=3 ; p=0,0065 (**), ns= non significatif, vs P01, test t).

Ces 3 populations ont été choisies d'une part pour étudier si le type de cellules somatiques d'origine pouvait influencer la différenciation, mais également pour étudier l'effet d'un contexte génétique différent et d'un type somatique différent sur la différenciation.

Les gènes *NANOG*, *POU5F1* (*OCT3/4*) et *SOX2* constituent le noyau de la pluripotence (section 1.3.1), raison pour laquelle ce sont les premiers gènes pour lesquels les populations d'iPSCs sont testées. D'après la **Figure 9**, il est possible d'observer que les iPSCs sont similaires aux cellules souches embryonnaires (ESCs). Suite à cette RT-qPCR il est possible d'affirmer que les 3 populations sont pluripotentes et similaires entre-elles. Néanmoins, la population iPSC-P03, semble exprimer significativement moins de *NANOG* que les deux autres (p : 0,0065). *NANOG*, en plus d'être lié à la pluripotence, joue un rôle crucial dans l'initiation de l'expression de *EOMES* qui coopère avec smad2/3 afin d'activer l'ensemble du réseau de signalisation clé dans l'induction de l'endoderme.

<i>Double positive</i>	NANOG/ POU5F1	NANOG/ SOX2
<i>iPSC-P01</i>	77,3% \pm 6,17	81,3% \pm 2,59
<i>iPSC-P02</i>	85,0% \pm 6,42	84,36% \pm 3,39
<i>iPSC-P03</i>	82,8% \pm 5,79	88,55% \pm 0,77

Figure 10 : Analyse en cytométrie en flux pour les marqueurs de pluripotence NANOG/POU5F1 et NANOG/SOX2 pour les 3 populations d'iPSCs (n=3, ns : non significatif, vs P01)

Afin de déterminer l'homogénéité des différentes populations d'iPSCs, une analyse en cytométrie en flux a été effectuée (Figure 10). Les doubles-positifs NANOG/POU5F1 et NANOG/SOX2 sont considérés ici, car ils permettent de mieux distinguer les cellules pleinement reprogrammées (106).

Il n'y a pas de différences significatives entre les 3 populations. Approximativement les mêmes pourcentages (moyennes) de cellules expriment l'ensemble des marqueurs de pluripotence : pour les double-positifs NANOG-POU5F1, 77,3% \pm 6,17%, 85,06% \pm 6,42% et 82,8% \pm 5,79% pour iPSC-P01, iPSC-P02 et iPSC-P03 respectivement (p=0,0527 ; ns). Pour les double-positifs NANOG-SOX2 : 81,3% \pm 2,59%, 84,36% \pm 3,39% et 88,55% \pm 0,77% pour iPSC-P01, iPSC-P02 et iPSC-P03 respectivement (p=0,177 ; ns).

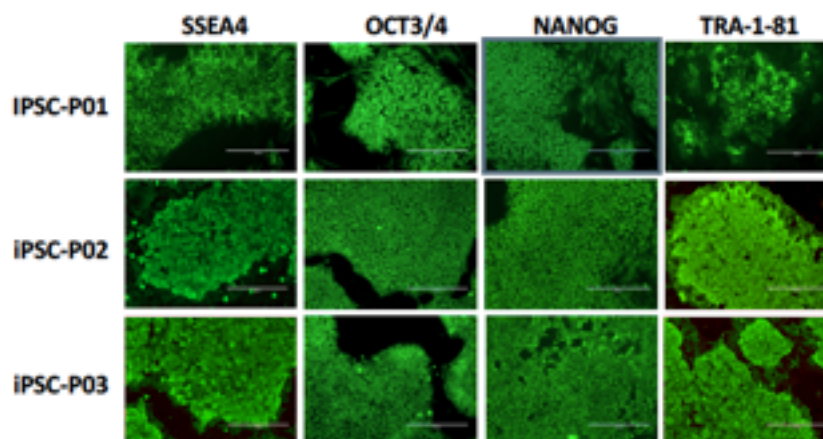


Figure 11 : Détermination de l'expression des marqueurs de pluripotence par immunocytochimie en fluorescence pour les 3 populations d'iPSCs.

À la microscopie, il est tout d'abord possible de distinguer la forme des colonies caractéristiques des cellules souches pluripotentes. D'autre part, en accord avec l'analyse de cytométrie en flux, un marquage par immunofluorescence nous montre que les 3 populations sont uniformes en ce qui à trait de l'expression des marqueurs de pluripotence, sans différence évidente (**Figure 11**). SSEA4 et TRA-1-81 sont d'autres gènes de pluripotence : il s'agit de marqueurs de surface caractéristiques des cellules embryonnaires.

b. État de pluripotence

Après avoir caractérisé les 3 populations d'iPSCs de la manière commune, nous avons décidé d'approfondir cette caractérisation en employant d'autres méthodes.

Dans la littérature (section introduction 1.4.4), différents types de pluripotence ont été mis en lumière. Ces différents types de pluripotence sont d'habitude employés pour les cellules souches embryonnaires. En effet, la pluripotence naïve est associée avec l'étape de pré-implantation de l'embryon, tandis que la pluripotence amorcée (« *primed* »), est, elle plus tardive et est associée avec le stade post-implantation de l'embryon.

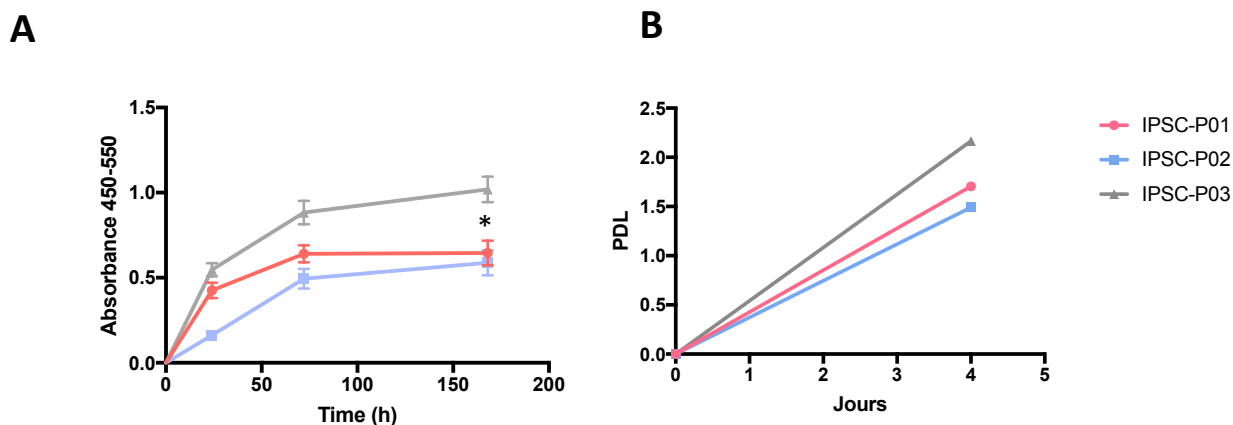


Figure 12 : Détermination de la vitesse de prolifération des 3 populations d'iPSCs par incorporation au BrdU (A) et par doublement de population (B) (n=3, * $p < 0.05$ vs P01, One-Way ANOVA PDL : *population doubling level*).

Ces deux types de pluripotence ont des caractéristiques distinctes telles que : des vitesses de prolifération différentes, des différences en termes de profil global de méthylation de l'ADN etc. Nous avons alors décidé d'investiguer ces caractéristiques sur nos différentes populations d'iPSCs dans l'hypothèse que les différences remarquées soient secondaires au degré de pluripotence.

Les 3 populations d'iPSCs ont été comparées en termes de prolifération par incorporation du BrdU (**Figure 12-A**), il est apparu que la population iPSC-P03, c'est-à-dire celle qui semble se différencier le moins bien en hépatocytes, a une vitesse de prolifération environ 3 fois supérieure aux deux autres populations ($n=4$, $p=0,0267$), ceci a été confirmé par un test de doublement de la population (données préliminaires) (**Figure 12-B**).

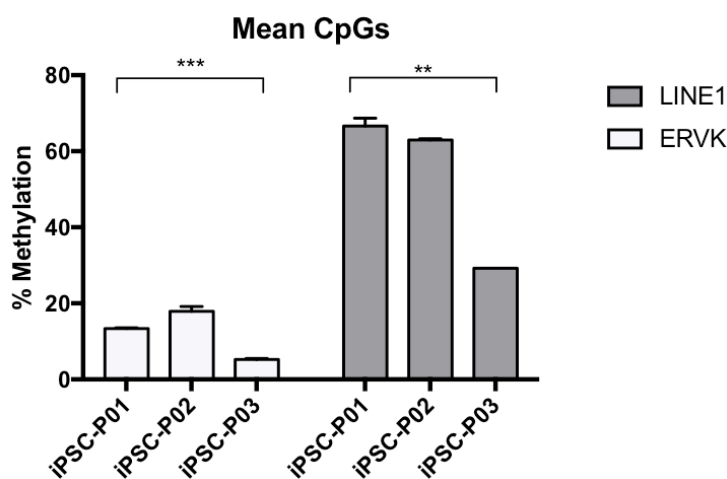


Figure 13 : Estimation du profil global de la méthylation de l'ADN par pyroséquençage pour les 3 populations d'iPSCs. ($n=3$; LINE $p: 0,0001$ (***), ERVK $p: 0,0011$ (**), vs P01, test t)

Comme précédemment évoqué, la méthylation joue un rôle très important quant à la reprogrammation des iPSCs (section 1.3.1). Ainsi, le profil global de méthylation permet de nous apporter des informations supplémentaires concernant la régulation de gènes clés acteurs actifs de la pluripotence.

Les longs éléments nucléaires intercalés (ou LINE pour *Long interspersed nuclear element*) sont un groupe de séquences répétées disséminées dans l'ADN et environ

21% du génome humain est constitué de LINE. De plus, 1/3 de la méthylation se produit au niveau de ces éléments répétitifs. Il a été démontré que LINE-1 est un bon indicateur de l'état de méthylation (107). Les retrovirus endogènes du groupe k, (ERVK ou *endogenous retrovirus group K*) sont des séquences terminales répétées de retrotransposons. En effet, la moitié du génome est composée de retrotransposons acquis au cours de l'évolution. Ces retrotransposons sont généralement régulés par méthylation de l'ADN (108).

Le profil de méthylation global de l'ADN, déterminé par pyroséquençage, diffère significativement entre les populations d'après le même schéma : en effet, encore une fois, la population iPSC-P03 se distingue nettement des deux autres. iPSC-P01 et iPSC-P02 ont une méthylation globale respectivement de 13,35% et 17,9% pour ERVK et 66,65% et 62,95% pour LINE1 tandis que iPSC-P03 a une méthylation globale de 5,22% pour ERVK et 29,2% pour LINE1. Il a été démontré que LINE1 représente environ 18% du génome humain et permet d'avoir une idée approximative du profil global de méthylation de l'ADN (**Figure 13**).

En d'autres termes, iPSC-P01 et iPSC-P02 ont un profil plus hyperméthylé, tandis que iPSC-P03 a un profil plus hypométhylé que les deux autres.

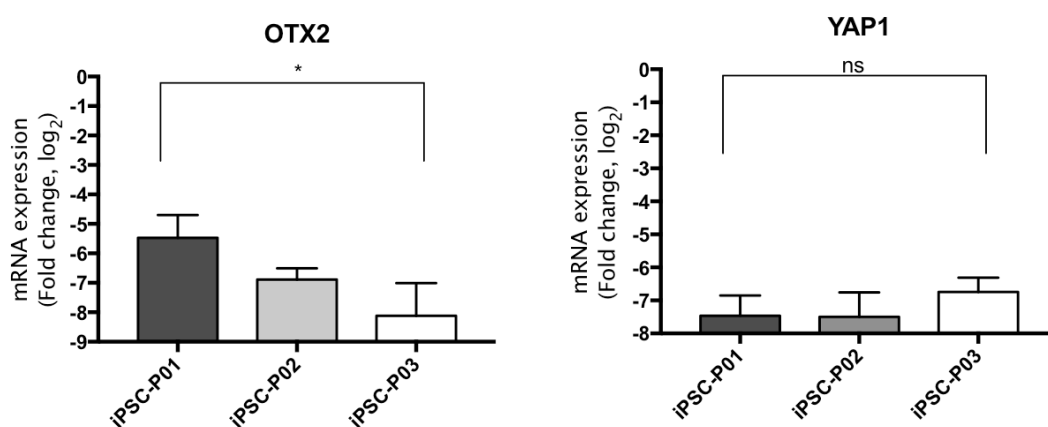


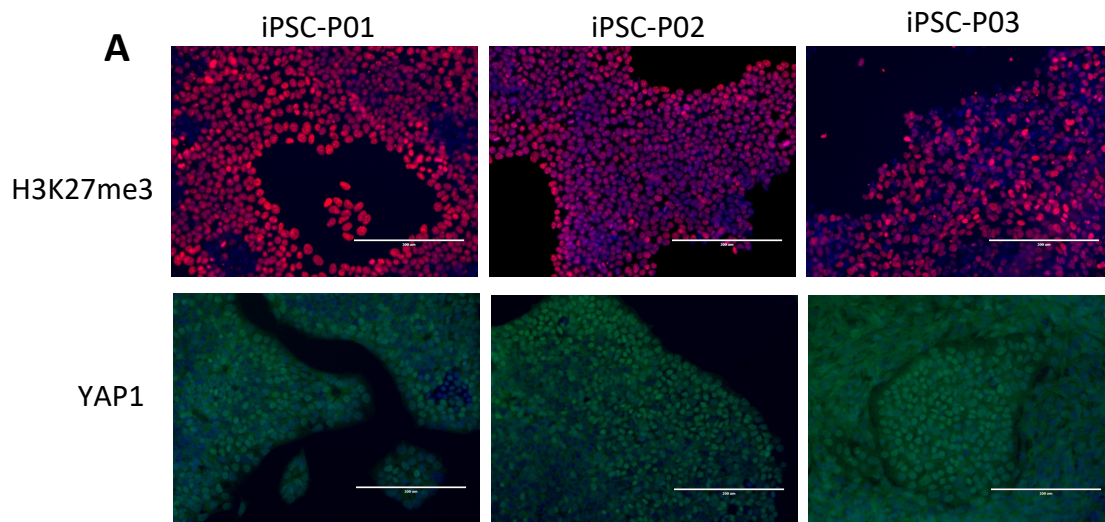
Figure 14: Établissement de nouveaux marqueurs pour estimer l'état de pluripotence et donc la capacité de différenciation par RT-qPCR (n=4 ; OTX2, * p < 0.05; YAP1, ns, vs P01, test t).

La transition de pluripotence naïve à pluripotence « amorcée » est associée, entre autres, à une relocalisation de POU5F1 (OCT3/4). Cette relocalisation entraîne un

réarrangement général du paysage de chromatine des amplificateurs. En effet, POU5F1 est redirigé vers des sites d'amplificateurs qui étaient auparavant inaccessibles, cette relocalisation est initiée par une surexpression d'OTX2.

Ainsi, en plus d'être connu pour être un marqueur de pluripotence qualifiée d'amorcée, OTX2 permet suite à la relocalisation d'OCT3/4 d'induire l'expression d'un ensemble d'autres gènes liés à la pluripotence amorcée(109). *YAP1*, est lui généralement exprimé dans au niveau de la masse cellulaire interne chez les blastocystes humains. Ce gène est impliqué dans la régulation de la pluripotence naïve par la modulation de la voie de signalisation Wnt/B-Catenine. De plus, il est essentiel pour un auto-renouveau efficace chez les iPSCs (110).

Nous avons donc décidé de mesurer l'expression d'OTX2 sur nos 3 populations d'iPSCs, dans le but de voir si cela pouvait apporter une explication à la différence de potentiel observée parmi les populations. De manière intéressante, le même classement entre les populations est apparu. En effet, iPSC-P03 exprime significativement moins d'OTX2 que les deux autres (n=4, p=0,0441) (**Figure 14**).



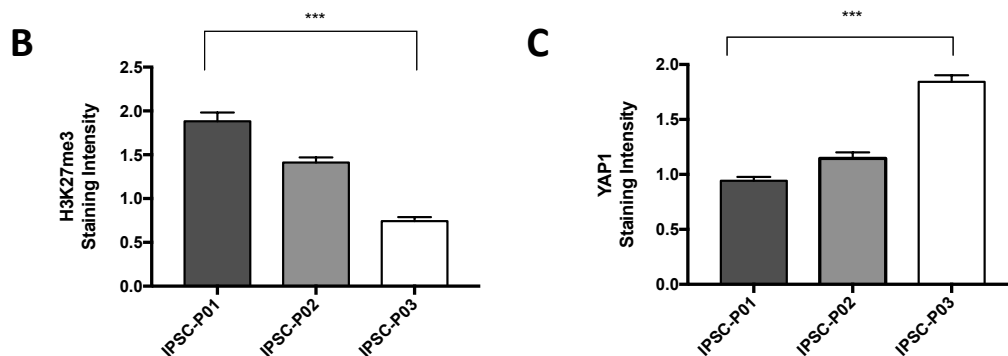


Figure 15 : Mesure de l'expression de H3K27me3 et YAP1 pour les 3 populations d'iPSCs par immunocytochimie en fluorescence (n=3, *** p <0.001, vs P01, test t).

YAP1 est un marqueur associé à la pluripotence naïve, cependant son expression parmi ces populations semble être non-significative. H3K27me3 est un marqueur de modification des histones, notamment connu pour freiner la transcription. Il apparaît que les populations iPSC-P01 et iPSC-P02 sont plus méthylées que la population iPSC-P03. En effet, les populations P01 et P02 possèdent plus de modifications épigénétiques H3K27me3 que la population P03 (**Figure 15-A-B**). Ces résultats corréleront donc avec le profil global de méthylation en Figure 13.

La synthèse protéique de YAP1 a également été mesurée (**Figure 15-A-C**), d'après la mesure de l'intensité il semble que YAP1 soit plus présent dans les iPSC-P03, cependant ces résultats ne concordent pas avec ceux de RT-qPCR présenté en **Figure 14**. Afin de pouvoir être fixé sur YAP1, il faudrait répéter l'immunocytochimie et augmenter aussi le n pour les RT-qPCR.

Suite à ces résultats, il semble que la population iPSC-P03 ait un profil plus naïf en termes de pluripotence que les deux autres, ce qui pourraient expliquer son potentiel de différenciation réduit par rapport aux deux autres populations. L'hypothèse qui expliquerait que cette population, malgré son potentiel pluripotent élevé, se différencie moins bien, et que le temps nécessaire pour que ce processus survienne est plus long.

5. L'état de pluripotence des iPSCs détermine leur dynamique de différenciation en endoderme

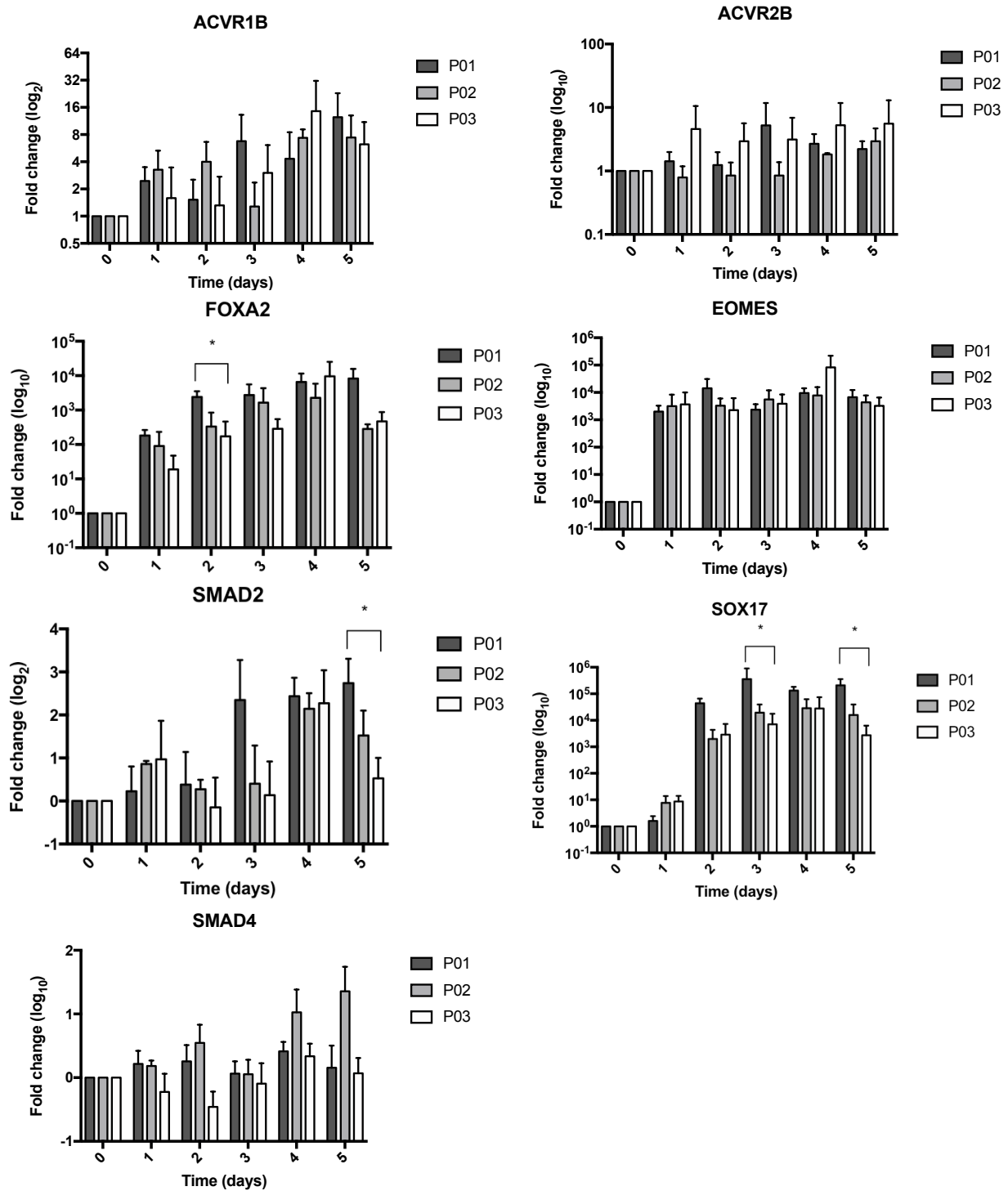


Figure 16 : Évolution dynamique de l'expression génique au cours de la différenciation en endoderme par RT-qPCR (n=3 ; * p < 0.05 vs P01, test t).

En partant du principe que la population iPSC-P03 aurait un profile de pluripotence plus naïf que les deux autres, nous avons émis l'hypothèse, qu'elle était en retard par rapport aux deux autres populations, ce que nous avons voulu vérifier par RT-qPCR. Rappelons que d'un point de vue temporel, la pluripotence naïve précède, la pluripotence amorcée. Nous avons donc différencié les 3 populations d'iPSCs en endoderme et arrêté la différenciation et regardé l'expression de gènes clés dans l'établissement de l'endoderme au cours du temps sur les 5 jours à chaque 24h. De manière intéressante, pour la plupart des gènes, la population iPSC-P03 est en retard par rapport aux deux autres populations (**Figure 16**). Ceci confirmant l'hypothèse de l'implication des deux types de pluripotence. Cependant, il reste à répéter cette expérience pour voir si la tendance devient significative et réduire les barres d'erreurs.

6. Agir sur l'état de pluripotence des iPSCs pour améliorer et uniformiser la qualité des cellules hépatiques obtenues.

ELABELA (ELA) est une hormone peptide qui est trouvée en circulation dans le sang, elle est déjà connue pour être impliquée dans de nombreux processus tels que le développement du cœur et l'angiogenèse. Cette hormone est sécrétée de façon endogène par les hESCs mais elle se lit à un récepteur pour l'instant inconnu. ELA jouerait un rôle de potentialisateur pour la voie de signalisation TGF-beta. De plus, elle augmenterait la survie et l'auto-renouvellement des hESCs via la voie de signalisation PI3K/AKT(111).

Nous avons décidé d'utiliser cette hormone pour voir l'effet qu'elle pourrait avoir sur les populations d'iPSCs difficile à différencier, notamment la population iPSC-P03. Nous avons essayé de faire varier les conditions. Tout d'abord nous avons testé ELA pendant 24 h sur les iPSCs et regardé l'expression des marqueurs de pluripotence ainsi que de OTX2 et YAP1 par qPCR.

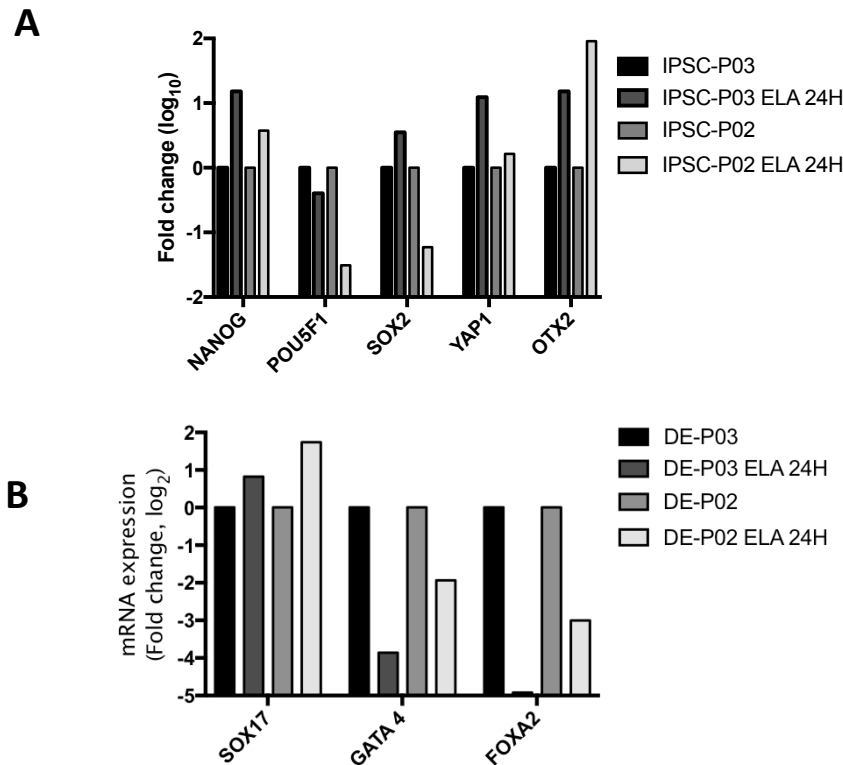


Figure 17 : Effet du traitement avec l'hormone-peptide ELABELA sur l'expression des marqueurs de pluripotence (A) et de l'endoderme (B) par RT-qPCR (n=1, données préliminaires).

D'après les résultats, ELA aurait un effet sur NANOG, qui rappelons-le était moins exprimé chez la population iPSC-P03 et qui est nécessaire au bon déroulement de l'induction de l'endoderme. Nous avons également exposé les iPSCs à ELA pendant 24H, puis nous les avons différenciés en endoderme définitif : de manière globale il apparaît que l'exposition à ELA permet une augmentation de l'expression de SOX17, ainsi qu'une baisse de l'expression de FOXA2, gène relatif à l'établissement de la ligne primitive (**Figure 17**).

À la lumière de l'ensemble de ces résultats, nous avons démontré, d'une part, que les 3 populations d'iPSCs avaient une différence de potentiel de différenciation en hépatocytes. D'autre part, nous avons également démontré que cette différence était

visible dès le stade de l'endoderme à Jour 5, ce qui évite de devoir se rendre jusqu'à la fin de la différenciation en hépatocyte (Jour 25) pour avoir à se rendre compte de telles disparités. De plus, il a été démontré que la caractérisation classique des iPSCs n'était pas suffisante pour expliquer cette différence. En effet, en tenant compte des propriétés connues attribuées aux différents états de pluripotence naïf et amorcé utilisés à l'origine pour caractériser les ESCs (voir Introduction, section 1.4), nous sommes arrivés à démontrer que chacune des 3 populations avait un statut de pluripotence différent, correspondant à leur capacité de différenciation. De surcroît, les résultats semblent indiquer que la population P03, ayant un profil plus naïf que les autres, aurait un retard d'expression lors de l'induction de l'endoderme par rapport aux deux autres. Enfin, dans le but de remédier au problème des populations d'iPSCs plus réticentes telles que la population P03, nous avons testé une hormone, ELABELA, qui semble agir, à la fois, sur l'auto-renouvellement des iPSCs ainsi que la favorisation de l'induction de l'endoderme. Les résultats semblent être prometteurs cependant, ils sont à répéter afin de confirmer cette tendance.

CHAPITRE IV : DISCUSSION & CONCLUSION

4.1 DISCUSSION

Bien que l'obtention d'hépatocytes *in vitro*, ait connu une avancée majeure, au cours de ces dernières années, de nombreuses importantes mises au point restent à accomplir aussi bien au niveau des iPSCs de base, mais également concernant les protocoles de différenciation employés, afin d'obtenir en bout de ligne de meilleurs résultats quant à la consistance et à la maturation des hépatocytes dérivés des iPSCs. Nos objectifs consistaient donc à 1) trouver des différences entre les populations d'iPSCs expliquant les différences observées en termes de potentiel de différenciation et essayer d'améliorer le protocole de différenciation en endoderme, et donc en hépatocytes, en fonction de ces différences et 2) Établir une corrélation entre les états de pluripotence des iPSCs et les stades de l'endoderme et hépatique. Ces objectifs se rejoignent dans l'idée d'apporter une amélioration significative quant à la reproductibilité et à la qualité des hépatocytes dérivés des iPSCs.

Les résultats présentés ont permis de mettre en lumière, le fait que les iPSCs ne sont pas toutes au même niveau d'un point de vue type de pluripotence, et qu'il faut en tenir compte avant de les différencier, car ceci peut avoir un effet sur leur potentiel de différenciation. Ainsi, la compréhension de la différenciation en 2D est déjà une étape clé en soi car de nombreuses populations d'iPSCs n'étaient pas capables de différencier, et les raisons n'étaient pas réellement connues et/ou investiguées.

4.1.2 État de pluripotence & Potentiel de différenciation

Comme démontré dans les résultats, le type de pluripotence joue un rôle clé dans la capacité de différenciation des iPSCs. Plus précisément, les 2 états de pluripotence, naïf et amorcé, utilisés pour caractériser les ESCs se sont avérés pouvoir être employés avec les iPSCs. En effet, la population iPSC-P03, différenciant le moins bien

s'est avérée, avoir beaucoup de caractéristiques communes avec un état de pluripotence naïf, à savoir, un faible taux de mortalité, une forte prolifération cellulaire, un profil de méthylation global plutôt hypométhylé, une expression plus faible d'OTX2, marqueur essentiel de la pluripotence amorcée et dont la surexpression est nécessaire pour quitter la pluripotence naïve pour aller vers la pluripotence amorcée (voir introduction section 1.4.1). À l'inverse, les populations d'iPSCs-P02 et -P01, différenciant beaucoup mieux, possédaient des caractéristiques plus proches de l'état de pluripotence amorcé, à savoir, une plus forte mortalité, une prolifération cellulaire plus faible, un profil méthylation globalement hyperméthylé, une plus forte expression d'OTX2.

Les distinctes caractéristiques de ces 2 états de pluripotence expliquent la différence existant parmi différentes populations d'iPSCs étudiées. Toutefois, certaines caractéristiques sont plus nuancées que d'autres, comme l'expression génique de YAP, gène impliqué dans la pluripotence naïve, laquelle n'a pas l'air d'être significative. Ceci peut s'expliquer par la présence d'un continuum entre les deux états de pluripotence. En effet, des études ont démontré l'existence de ce qui pourrait s'apparenter à ce continuum d'états de pluripotence (109), cependant, certains stades de pluripotence ne semblent pas s'appliquer pour les humains, ou sont plus facilement observables chez la souris ou les rongeurs (112). En effet, la pluripotence naïve humaine n'a pas encore été démontrée clairement (113), ce qui laisse place à de nombreuses autres hypothèses pouvant expliquer différents potentiels de différenciation.

Comme évoqué précédemment, le processus de reprogrammation entraîne d'importants changements au niveau de la cellule somatique d'origine aussi bien sur le plan d'expression génique qu'épigénétique. Des études ont démontré que durant ce processus de reprogrammation, des sous-populations différentes l'une de l'autre s'établissaient (114). Ainsi, une sous-population d'iPSCs pourraient être plus pluripotente qu'une autre (115). De plus, certaines sous-population pourraient n'être que partiellement reprogrammées (116). Des recherches ont démontré que les iPSCs partiellement reprogrammées avaient un potentiel de différenciation amoindri par

rapport aux iPSCs entièrement reprogrammées (117). Ainsi, il serait pertinent de regarder les caractéristiques d'une population partiellement reprogrammée afin de voir si ces caractéristiques se retrouvent dans la population iPSC-P03. Néanmoins, à ce jour, les caractéristiques des populations considérées comme partiellement reprogrammées sont encore très méconnues. D'autre part, la caractérisation réalisée sur cette population, et notamment l'analyse en cytométrie de flux permettant d'évaluer son homogénéité, n'a pas révélé de grandes différences par rapport aux deux autres populations.

Un autre aspect mis en lumière par ce projet, est le véritable intérêt d'utiliser l'endoderme comme indicateur de qualité pour les hépatocytes dérivés des iPSCs. En effet, une réelle corrélation entre l'état de pluripotence, et à la fois les stades de l'endoderme et hépatique a été établie. Les résultats ont démontré, que lorsque la population d'iPSCs avait un profil d'état de pluripotence plus « naïf » (iPSC-P03), les marqueurs de l'endoderme étaient significativement moins exprimés, et de ce fait, la qualité des hépatocytes à la fin de la différenciation, était moins bonne d'un point de vue expression des marqueurs hépatiques, mais également d'un point de vue fonctionnel. Ces résultats ont également été confirmés à la fois par RNA-seq en comparant les iPSCs et l'endoderme définitif pour chacune des 3 populations d'iPSCs à l'étude, ainsi que par le séquençage de méthylation (RRBS) (Résultats non inclus dans ce mémoire).

De plus, la dynamique d'expression des marqueurs de l'endoderme a été établie pour les 3 populations, il a été démontré que la population iPSC-P03, plus naïve, avait un délai d'expression comparé aux deux autres. Ceci appuie la théorie des 2 états de pluripotence naïf & amorcé correspondant respectivement au stade de pré-implantation et post-implantation. Ainsi, la population iPSC-P03 aurait peut-être besoin de plus de temps pour se différencier que les deux autres.

Ces résultats sont cruciaux d'une part concernant la reproductibilité des différenciations hépatiques, mais également tous les tissus dérivés de l'endoderme. D'autre part, la thérapie cellulaire autologue est limitée à cause du potentiel de

différenciation variable d'une population d'iPSCs à l'autre. Ce projet apporte une partie de réponse aux questions soulevées par ce problème. En effet, dans ce domaine, il faut souvent travailler avec le matériel dont on dispose, à savoir, une population d'iPSCs dérivées des cellules somatiques d'un patient. Lorsque cette population n'est pas apte à bien différencier, cela pose un problème conséquent. Ce projet apporte une façon de pouvoir déterminer à partir de marqueurs des différents états de pluripotence, si la population sera apte ou non à bien différencier.

4.2 PERSPECTIVES & DIRECTIONS FUTURES

4.2.1 Directions

Bien que nos résultats soient très prometteurs, il reste néanmoins beaucoup de points sur lesquels travailler pour apporter encore plus d'améliorations à la différenciation en hépatocytes à partir de cellules souches pluripotentes induites. Comme déjà évoqué, la différenciation ayant pour but de mimer l'organogenèse de l'organe d'intérêt, beaucoup de facteurs de croissance et/ou cytokines intervenant à différentes étapes de l'organogenèse du foie n'ont pas été prises en compte dans de nombreux protocoles de différenciation en hépatocytes. Notamment, en plus du septum transverse et du mésoderme cardiaque avoisinant l'endoderme et permettant l'avènement de l'endoderme hépatique, il y a également le rôle du pancréas à prendre en compte, dont certains facteurs clés, en plus de l'insuline, jouent un rôle dans l'établissement du foie.

En plus d'autres facteurs apportés par les organes avoisinant lors de l'embryogénèse, il faut également tenir compte du facteur spatio-temporel. En effet, il a été démontré que les gradients de facteurs de croissance jouaient un rôle déterminant dans l'engagement d'une cellule vers une voie plutôt qu'une autre. De plus, la durée de l'exposition à ces facteurs de croissance, ainsi que le moment de l'exposition sont également cruciaux. Il faudrait donc essayer de nombreuses combinaisons tenant compte de tous les points cités dans le but de pouvoir établir un meilleur protocole de différenciation en hépatocytes. De surcroît, le fait que, *in vivo*, le

foie demande 9 mois pour se former est non-négligeable. Il est possible que sur ce point la science ne puisse pas aller plus vite que la nature et que les hépatocytes *in vitro* aient également besoin d'autant de temps pour maturer suffisamment.

Néanmoins, comme évoqué précédemment, le foie est un organe plus complexe que d'autres. Cette complexité se traduit par le fait que les cellules fonctionnelles du foie, les hépatocytes, doivent assurer à elles seules plus de 400 fonctions. Lorsque l'on regarde dans la littérature, seulement une poignée de ces fonctions sont testées. Il est donc indispensable d'explorer ces autres fonctions et de s'assurer que les protocoles de différenciation permettent leur plein développement.

À propos du projet, il reste évidemment à augmenter le nombre de populations d'iPSCs à tester, afin de voir s'il est réellement possible de pouvoir prédire, avec un plus grand n , la qualité de la différenciation. Le défi reste toutefois de trouver des populations d'iPSCs ayant une capacité de différencier en hépatocytes très différente, dans le but de reconfirmer encore une fois nos hypothèses initiales. Il serait également intéressant de tester la différenciation dans les autres dérivés de l'endoderme à partir de 3 populations.

4.2.2 Perspectives futures

Les résultats obtenus en différenciation 2D peuvent nous permettre d'utiliser les hépatocytes issus des iPSCs pour modéliser certaines maladies *in vitro*. Concernant la différenciation en 2D, celle-ci a déjà été utilisée et a contribué à mettre en place le premier modèle de tyrosinémie I *in vitro*.

En effet, la tyrosinémie de type I ou la tyrosinémie hépatorénale (HT1) est une maladie d'ordre génétique, elle implique différents organes tels que principalement le foie et les reins. Ce type de tyrosinémie est considéré comme le plus sévère. Elle se caractérise principalement par l'incapacité de produire la fumarylacetoacetate hydroxylase (FAH). L'absence de cette enzyme provoque une accumulation de métabolites toxiques, tels que le succinylacetoacétate (SAA), qui peuvent s'avérer être létaux à un très jeune âge sans traitements. De plus, cette maladie affecte lourdement la vie des patients, car ils sont soumis à une lourde diète, étant incapable de dégrader la tyrosine contenue dans

les aliments. À ce jour le seul traitement disponible, en dehors d'une greffe d'organe pour cette maladie, est la nitisinone (NTBC). La NTBC permet d'augmenter la survie, mais cependant les effets à long-terme de ce traitement ne sont toujours pas connus. En effet, la NTBC est à l'origine un herbicide, qui à cause de son efficacité pour cette maladie a sauté les essais cliniques 2 et 3. Cette maladie constitue en effet, un bon candidat pour être un modèle de maladie *in vitro* car la tyrosinémie de type I présente des manifestations cliniques qui pourraient être observables et étudiées *in vitro*. Ainsi, les cellules périphériques mononucléaires du sang (PBMC) d'un patient atteint de tyrosinémie ont été reprogrammées en iPSCs en utilisant un virus incapable de s'intégrer dans l'ADN des cellules. Une fois les cellules reprogrammées, celles-ci ont été caractérisées, afin de démontrer qu'il s'agit bien de cellules pluripotentes. Par la suite ces iPSCs ont été différenciées en hépatocytes afin de pouvoir d'une part servir de modèle *in vitro* de la maladie, mais également permettre la thérapie cellulaire, une fois la mutation corrigée. Les hépatocytes dérivés des iPSCs des patients ont arboré un phénotype caractéristique permettant une meilleure étude de la maladie *in vitro*.

Concernant la culture en 3D, nous avons déjà été capables d'obtenir des organoïdes hépatiques, avec des hépatocytes primaires ainsi qu'avec des iPSCs différenciées. Des résultats encourageants ont déjà été obtenus et permettent l'envisagement de leur utilisation à la fois pour tester de nouvelles substances médicamenteuses, mais également pour modéliser des maladies *in vitro*. Il serait possible d'utiliser le même concept pour étudier des physiopathologies hépatiques, en examinant le rôle des différents types cellulaires impliqués dans la formation des organoïdes hépatiques. De plus, ces organoïdes hépatiques, une fois encapsulés pourront être implantés chez des souris ayant une déficience hépatique, afin de voir si ces organoïdes sont capables de rétablir la fonction hépatique. D'autre part, ces organoïdes pourraient également être utilisés pour étudier le développement, ainsi que les interactions entre cellules au sein d'un environnement hépatique, mais également la différenciation ou la dé-différenciation des hépatocytes au sein de l'organoïde.

4.3 CONCLUSION

Nous avons démontré qu'une amélioration de la différenciation en 2D était possible, dans le but de fournir de meilleurs outils pour la modélisation de maladies hépatiques. De plus, un nouvel élément de réponse expliquant la disparité de potentiel de différenciation au sein des iPSCs a été apporté. En effet, nos recherches ont démontré que le statut de pluripotence jouait un rôle important en vue d'obtenir de bons hépatocytes *in vitro*.

En somme, l'ensemble de ces travaux permet de conclure qu'il est nécessaire de tenir compte du statut de pluripotence des iPSCs et d'adapter les protocoles de différenciation en fonction.

Références:

1. Zeilinger K, Freyer N, Damm G, Seehofer D, Knospel F. Cell sources for in vitro human liver cell culture models. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2016;241(15):1684-98.
2. Bhogal RH, Hodson J, Bartlett DC, Weston CJ, Curbishley SM, Haughton E, et al. Isolation of primary human hepatocytes from normal and diseased liver tissue: a one hundred liver experience. *PLoS One*. 2011;6(3):e18222.
3. Zeigerer A, Wuttke A, Marsico G, Seifert S, Kalaidzidis Y, Zerial M. Functional properties of hepatocytes in vitro are correlated with cell polarity maintenance. *Exp Cell Res*. 2017;350(1):242-52.
4. Heslop JA, Rowe C, Walsh J, Sison-Young R, Jenkins R, Kamalian L, et al. Mechanistic evaluation of primary human hepatocyte culture using global proteomic analysis reveals a selective dedifferentiation profile. *Arch Toxicol*. 2017;91(1):439-52.
5. Soldatow VY, Lecluyse EL, Griffith LG, Rusyn I. In vitro models for liver toxicity testing. *Toxicol Res (Camb)*. 2013;2(1):23-39.
6. Gerets HH, Tilmant K, Gerin B, Chanteux H, Depelchin BO, Dhalluin S, et al. Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins. *Cell Biol Toxicol*. 2012;28(2):69-87.
7. McGill MR, Yan HM, Ramachandran A, Murray GJ, Rollins DE, Jaeschke H. HepaRG cells: a human model to study mechanisms of acetaminophen hepatotoxicity. *Hepatology*. 2011;53(3):974-82.
8. Ullah I, Subbarao RB, Rho GJ. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Biosci Rep*. 2015;35(2).
9. Wang Y, Yu X, Chen E, Li L. Liver-derived human mesenchymal stem cells: a novel therapeutic source for liver diseases. *Stem Cell Res Ther*. 2016;7(1):71.
10. Valle-Prieto A, Conget PA. Human mesenchymal stem cells efficiently manage oxidative stress. *Stem Cells Dev*. 2010;19(12):1885-93.
11. Wu XB, Tao R. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2012;11(4):360-71.
12. Carpentier A, Nimgaonkar I, Chu V, Xia Y, Hu Z, Liang TJ. Hepatic differentiation of human pluripotent stem cells in miniaturized format suitable for high-throughput screen. *Stem Cell Res*. 2016;16(3):640-50.
13. Kajiwarra M, Aoi T, Okita K, Takahashi R, Inoue H, Takayama N, et al. Donor-dependent variations in hepatic differentiation from human-induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(31):12538-43.
14. Tomotsune D, Hirashima K, Fujii M, Yue F, Matsumoto K, Takizawa-Shirasawa S, et al. Enrichment of Pluripotent Stem Cell-Derived Hepatocyte-Like Cells by Ammonia Treatment. *PLoS One*. 2016;11(9):e0162693.
15. Huang G, Ye S, Zhou X, Liu D, Ying QL. Molecular basis of embryonic stem cell self-renewal: from signaling pathways to pluripotency network. *Cell Mol Life Sci*. 2015;72(9):1741-57.
16. Lo B, Parham L. Ethical issues in stem cell research. *Endocr Rev*. 2009;30(3):204-13.

17. Gadue P, Huber TL, Nostro MC, Kattman S, Keller GM. Germ layer induction from embryonic stem cells. *Exp Hematol*. 2005;33(9):955-64.
18. Patel M, Yang S. Advances in reprogramming somatic cells to induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Rev*. 2010;6(3):367-80.
19. Robinton DA, Daley GQ. The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature*. 2012;481(7381):295-305.
20. Vaskova EA, Stekleneva AE, Medvedev SP, Zakian SM. "Epigenetic memory" phenomenon in induced pluripotent stem cells. *Acta Naturae*. 2013;5(4):15-21.
21. Burrows CK, Banovich NE, Pavlovic BJ, Patterson K, Gallego Romero I, Pritchard JK, et al. Genetic Variation, Not Cell Type of Origin, Underlies the Majority of Identifiable Regulatory Differences in iPSCs. *PLoS Genet*. 2016;12(1):e1005793.
22. Sauer V, Roy-Chowdhury N, Guha C, Roy-Chowdhury J. Induced pluripotent stem cells as a source of hepatocytes. *Curr Pathobiol Rep*. 2014;2(1):11-20.
23. Goldring C, Antoine DJ, Bonner F, Crozier J, Denning C, Fontana RJ, et al. Stem cell-derived models to improve mechanistic understanding and prediction of human drug-induced liver injury. *Hepatology*. 2017;65(2):710-21.
24. Carlsson R, Engvall E, Freeman A, Ruoslahti E. Laminin and fibronectin in cell adhesion: enhanced adhesion of cells from regenerating liver to laminin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981;78(4):2403-6.
25. Hess MW, Pfaller K, Ebner HL, Beer B, Hekl D, Seppi T. 3D versus 2D cell culture implications for electron microscopy. *Methods Cell Biol*. 2010;96:649-70.
26. Gissen P, Arias IM. Structural and functional hepatocyte polarity and liver disease. *J Hepatol*. 2015;63(4):1023-37.
27. Elaut G, Henkens T, Papeleu P, Snykers S, Vinken M, Vanhaecke T, et al. Molecular mechanisms underlying the dedifferentiation process of isolated hepatocytes and their cultures. *Curr Drug Metab*. 2006;7(6):629-60.
28. Conway-Myers BA. Co-culture update: creating an embryotrophic environment in vitro. *Semin Reprod Endocrinol*. 1998;16(3):175-82.
29. Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol*. 2014;12(4):207-18.
30. Li Y, Kilian KA. Bridging the Gap: From 2D Cell Culture to 3D Microengineered Extracellular Matrices. *Adv Healthc Mater*. 2015;4(18):2780-96.
31. Asai A, Aihara E, Watson C, Mourya R, Mizuochi T, Shivakumar P, et al. Paracrine signals regulate human liver organoid maturation from induced pluripotent stem cells. *Development*. 2017;144(6):1056-64.
32. Antoni D, Burckel H, Josset E, Noel G. Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo. *Int J Mol Sci*. 2015;16(3):5517-27.
33. Gupta N, Liu JR, Patel B, Solomon DE, Vaidya B, Gupta V. Microfluidics-based 3D cell culture models: Utility in novel drug discovery and delivery research. *Bioengineering & Translational Medicine*. 2016;1(1):63-81.
34. Peng G, Liu H, Fan Y. Biomaterial Scaffolds for Reproductive Tissue Engineering. *Ann Biomed Eng*. 2017;45(7):1592-607.

35. Castell JV, Gomez-Lechon MJ. Liver cell culture techniques. *Methods Mol Biol.* 2009;481:35-46. Epub 2008/12/20.
36. Ng SS, Xiong A, Nguyen K, Masek M, No DY, Elazar M, et al. Long-term culture of human liver tissue with advanced hepatic functions. *JCI Insight.* 2017;2(11). Epub 2017/06/02.
37. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006;126(4):663-76. Epub 2006/08/15.
38. Krause MN, Sancho-Martinez I, Izpisua Belmonte JC. Understanding the molecular mechanisms of reprogramming. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;473(3):693-7. Epub 2015/12/15.
39. David L, Polo JM. Phases of reprogramming. *Stem Cell Res.* 2014;12(3):754-61.
40. Singh AM, Dalton S. The cell cycle and Myc intersect with mechanisms that regulate pluripotency and reprogramming. *Cell Stem Cell.* 2009;5(2):141-9.
41. Zhang J, Nuebel E, Daley GQ, Koehler CM, Teitell MA. Metabolic regulation in pluripotent stem cells during reprogramming and self-renewal. *Cell Stem Cell.* 2012;11(5):589-95.
42. Ji P, Manupipatpong S, Xie N, Li Y. Induced Pluripotent Stem Cells: Generation Strategy and Epigenetic Mystery behind Reprogramming. *Stem Cells Int.* 2016;2016:8415010.
43. Buganim Y, Faddah DA, Jaenisch R. Mechanisms and models of somatic cell reprogramming. *Nat Rev Genet.* 2013;14(6):427-39.
44. Pan G, Thomson JA. Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Res.* 2007;17(1):42-9. Epub 2007/01/11.
45. Zeineddine D, Hammoud AA, Mortada M, Boeuf H. The Oct4 protein: more than a magic stemness marker. *Am J Stem Cells.* 2014;3(2):74-82. Epub 2014/09/19.
46. Zhang S, Cui W. Sox2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural differentiation. *World J Stem Cells.* 2014;6(3):305-11. Epub 2014/08/16.
47. Gordillo M, Evans T, Gouon-Evans V. Orchestrating liver development. *Development.* 2015;142(12):2094-108.
48. Marikawa Y, Alarcon VB. Establishment of trophectoderm and inner cell mass lineages in the mouse embryo. *Mol Reprod Dev.* 2009;76(11):1019-32.
49. Saiz N, Plusa B. Early cell fate decisions in the mouse embryo. *Reproduction.* 2013;145(3):R65-80.
50. Artus J, Panthier JJ, Hadjantonakis AK. A role for PDGF signaling in expansion of the extra-embryonic endoderm lineage of the mouse blastocyst. *Development.* 2010;137(20):3361-72. Epub 2010/09/10.
51. Schrode N, Saiz N, Di Talia S, Hadjantonakis AK. GATA6 levels modulate primitive endoderm cell fate choice and timing in the mouse blastocyst. *Dev Cell.* 2014;29(4):454-67. Epub 2014/05/20.
52. Sumi T, Oki S, Kitajima K, Meno C. Epiblast ground state is controlled by canonical Wnt/beta-catenin signaling in the postimplantation mouse embryo and epiblast stem cells. *PLoS One.* 2013;8(5):e63378.
53. Mulas C, Kalkan T, Smith A. NODAL Secures Pluripotency upon Embryonic Stem Cell Progression from the Ground State. *Stem Cell Reports.* 2017;9(1):77-91.

54. Tremblay KD, Hoodless PA, Bikoff EK, Robertson EJ. Formation of the definitive endoderm in mouse is a Smad2-dependent process. *Development*. 2000;127(14):3079-90.
55. Mikawa T, Poh AM, Kelly KA, Ishii Y, Reese DE. Induction and patterning of the primitive streak, an organizing center of gastrulation in the amniote. *Dev Dyn*. 2004;229(3):422-32.
56. Tam PP, Loebel DA. Gene function in mouse embryogenesis: get set for gastrulation. *Nat Rev Genet*. 2007;8(5):368-81.
57. Yamashita S, Miyagi C, Carmany-Rampey A, Shimizu T, Fujii R, Schier AF, et al. Stat3 Controls Cell Movements during Zebrafish Gastrulation. *Dev Cell*. 2002;2(3):363-75. Epub 2002/03/07.
58. Bartscher I, Lickert H. Foxa2 regulates polarity and epithelialization in the endoderm germ layer of the mouse embryo. *Development*. 2009;136(6):1029-38.
59. Zhao R, Duncan SA. Embryonic development of the liver. *Hepatology*. 2005;41(5):956-67.
60. Sadler TW. *Medical Embryology*. 12th^e éd2012.
61. Si-Tayeb K, Lemaigre FP, Duncan SA. Organogenesis and development of the liver. *Dev Cell*. 2010;18(2):175-89.
62. Zorn AM. Liver development. *StemBook*. Cambridge (MA)2008.
63. Finley KR, Tennessen J, Shawlot W. The mouse secreted frizzled-related protein 5 gene is expressed in the anterior visceral endoderm and foregut endoderm during early post-implantation development. *Gene Expr Patterns*. 2003;3(5):681-4.
64. Ober EA, Verkade H, Field HA, Stainier DY. Mesodermal Wnt2b signalling positively regulates liver specification. *Nature*. 2006;442(7103):688-91.
65. Nagaoka M, Duncan SA. Transcriptional control of hepatocyte differentiation. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2010;97:79-101.
66. Ye JS, Su XS, Stoltz JF, de Isla N, Zhang L. Signalling pathways involved in the process of mesenchymal stem cells differentiating into hepatocytes. *Cell Prolif*. 2015;48(2):157-65.
67. Lemaigre FP. Mechanisms of liver development: concepts for understanding liver disorders and design of novel therapies. *Gastroenterology*. 2009;137(1):62-79.
68. Michalopoulos GK, Bowen WC, Mule K, Luo J. HGF-, EGF-, and dexamethasone-induced gene expression patterns during formation of tissue in hepatic organoid cultures. *Gene Expr*. 2003;11(2):55-75.
69. Kamiya A, Kinoshita T, Miyajima A. Oncostatin M and hepatocyte growth factor induce hepatic maturation via distinct signaling pathways. *FEBS Lett*. 2001;492(1-2):90-4.
70. Kamiya A, Kinoshita T, Ito Y, Matsui T, Morikawa Y, Senba E, et al. Fetal liver development requires a paracrine action of oncostatin M through the gp130 signal transducer. *EMBO J*. 1999;18(8):2127-36.
71. Okita K. *Stem Cell and Liver Regeneration*: Springer Science & Business Media; 2003.
72. Oh HY, Namkoong S, Lee SJ, Por E, Kim CK, Billiar TR, et al. Dexamethasone protects primary cultured hepatocytes from death receptor-mediated apoptosis by upregulation of cFLIP. *Cell Death Differ*. 2006;13(3):512-23.
73. Mork LM, Strom SC, Mode A, Ellis EC. Addition of Dexamethasone Alters the Bile Acid Composition by Inducing CYP8B1 in Primary Cultures of Human Hepatocytes. *J Clin Exp Hepatol*. 2016;6(2):87-93.

74. Gelehrter TD, Emanuel JR, Spencer CJ. Induction of tyrosine aminotransferase by dexamethasone, insulin, and serum. Characterization of the induced enzyme. *J Biol Chem.* 1972;247(19):6197-203.
75. Hay DC, Zhao D, Fletcher J, Hewitt ZA, McLean D, Urruticoechea-Uriquen A, et al. Efficient differentiation of hepatocytes from human embryonic stem cells exhibiting markers recapitulating liver development in vivo. *Stem Cells.* 2008;26(4):894-902.
76. Kumari D. States of Pluripotency: Naïve and Primed Pluripotent Stem Cells. Dans: Tomizawa M, rédacteur. *Pluripotent Stem Cells - From the Bench to the Clinic* 2016.
77. Kalkan T, Olova N, Roode M, Mulas C, Lee HJ, Nett I, et al. Tracking the embryonic stem cell transition from ground state pluripotency. *Development.* 2017;144(7):1221-34.
78. Li M, Belmonte JC. Ground rules of the pluripotency gene regulatory network. *Nat Rev Genet.* 2017;18(3):180-91.
79. Stuart HT, van Oosten AL, Radzisheuskaya A, Martello G, Miller A, Dietmann S, et al. NANOG amplifies STAT3 activation and they synergistically induce the naive pluripotent program. *Curr Biol.* 2014;24(3):340-6.
80. Liu X, Nefzger CM, Rossello FJ, Chen J, Knaupp AS, Firas J, et al. Comprehensive characterization of distinct states of human naive pluripotency generated by reprogramming. *Nat Methods.* 2017;14(11):1055-62.
81. Chung KM, Kolling FWt, Gajdosik MD, Burger S, Russell AC, Nelson CE. Single cell analysis reveals the stochastic phase of reprogramming to pluripotency is an ordered probabilistic process. *PLoS One.* 2014;9(4):e95304. Epub 2014/04/20.
82. Soufi A, Donahue G, Zaret KS. Facilitators and impediments of the pluripotency reprogramming factors' initial engagement with the genome. *Cell.* 2012;151(5):994-1004. Epub 2012/11/20.
83. Hewitt KJ, Garlick JA. Cellular reprogramming to reset epigenetic signatures. *Mol Aspects Med.* 2013;34(4):841-8.
84. Liang G, Zhang Y. Genetic and epigenetic variations in iPSCs: potential causes and implications for application. *Cell Stem Cell.* 2013;13(2):149-59. Epub 2013/08/06.
85. Kilpinen H, Goncalves A, Leha A, Afzal V, Alasoo K, Ashford S, et al. Common genetic variation drives molecular heterogeneity in human iPSCs. *Nature.* 2017;546(7658):370-5. Epub 2017/05/11.
86. Marinho PA, Chailangkarn T, Muotri AR. Systematic optimization of human pluripotent stem cells media using Design of Experiments. *Sci Rep.* 2015;5:9834.
87. Kytala A, Moraghebi R, Valensisi C, Kettunen J, Andrus C, Pasumathy KK, et al. Genetic Variability Overrides the Impact of Parental Cell Type and Determines iPSC Differentiation Potential. *Stem Cell Reports.* 2016;6(2):200-12. Epub 2016/01/19.
88. Nishizawa M, Chonabayashi K, Nomura M, Tanaka A, Nakamura M, Inagaki A, et al. Epigenetic Variation between Human Induced Pluripotent Stem Cell Lines Is an Indicator of Differentiation Capacity. *Cell Stem Cell.* 2016;19(3):341-54.
89. Soto-Gutierrez A, Navarro-Alvarez N, Caballero-Corbalan J, Tanaka N, Kobayashi N. Endoderm induction for hepatic and pancreatic differentiation of ES cells. *Acta Med Okayama.* 2008;62(2):63-8.

90. Keller GM. In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Curr Opin Cell Biol.* 1995;7(6):862-9.
91. Pauklin S, Vallier L. Activin/Nodal signalling in stem cells. *Development.* 2015;142(4):607-19. Epub 2015/02/12.
92. Teo AK, Valdez IA, Dirice E, Kulkarni RN. Comparable generation of activin-induced definitive endoderm via additive Wnt or BMP signaling in absence of serum. *Stem Cell Reports.* 2014;3(1):5-14.
93. Faial T, Bernardo AS, Mendjan S, Diamanti E, Ortmann D, Gentsch GE, et al. Brachyury and SMAD signalling collaboratively orchestrate distinct mesoderm and endoderm gene regulatory networks in differentiating human embryonic stem cells. *Development.* 2015;142(12):2121-35. Epub 2015/05/28.
94. Teo AK, Arnold SJ, Trotter MW, Brown S, Ang LT, Chng Z, et al. Pluripotency factors regulate definitive endoderm specification through eomesodermin. *Genes Dev.* 2011;25(3):238-50.
95. Hart AH, Hartley L, Sourris K, Stadler ES, Li R, Stanley EG, et al. Mixl1 is required for axial mesendoderm morphogenesis and patterning in the murine embryo. *Development.* 2002;129(15):3597-608. Epub 2002/07/16.
96. Teo AK, Ali Y, Wong KY, Chipperfield H, Sadasivam A, Poobalan Y, et al. Activin and BMP4 synergistically promote formation of definitive endoderm in human embryonic stem cells. *Stem Cells.* 2012;30(4):631-42.
97. Spence JR, Lange AW, Lin SC, Kaestner KH, Lowy AM, Kim I, et al. Sox17 regulates organ lineage segregation of ventral foregut progenitor cells. *Dev Cell.* 2009;17(1):62-74. Epub 2009/07/22.
98. Rojas A, Schachterle W, Xu SM, Black BL. An endoderm-specific transcriptional enhancer from the mouse Gata4 gene requires GATA and homeodomain protein-binding sites for function in vivo. *Dev Dyn.* 2009;238(10):2588-98. Epub 2009/09/25.
99. Mizoguchi T, Verkade H, Heath JK, Kuroiwa A, Kikuchi Y. Sdf1/Cxcr4 signaling controls the dorsal migration of endodermal cells during zebrafish gastrulation. *Development.* 2008;135(15):2521-9. Epub 2008/06/27.
100. Sinner D, Kirilenko P, Rankin S, Wei E, Howard L, Kofron M, et al. Global analysis of the transcriptional network controlling *Xenopus* endoderm formation. *Development.* 2006;133(10):1955-66. Epub 2006/05/03.
101. Ding Y, Yang H, Yu L, Xu CL, Zeng Y, Qiu Y, et al. Feeder-free and xeno-free culture of human pluripotent stem cells using UCBS matrix. *Cell Biol Int.* 2015;39(10):1111-9. Epub 2015/05/06.
102. Loh KM, Ang LT, Zhang J, Kumar V, Ang J, Auyeong JQ, et al. Efficient endoderm induction from human pluripotent stem cells by logically directing signals controlling lineage bifurcations. *Cell Stem Cell.* 2014;14(2):237-52. Epub 2014/01/15.
103. Kanninen LK, Harjumäki R, Peltoniemi P, Bogacheva MS, Salmi T, Porola P, et al. Laminin-511 and laminin-521-based matrices for efficient hepatic specification of human pluripotent stem cells. *Biomaterials.* 2016;103:86-100. Epub 2016/07/04.
104. Abcam. Human Albumin ELISA Kit : 2017 ; . Disponible: <http://www.abcam.com/human-albumin-elisa-kit-ab108788.html>

105. Ronaghi M, Uhlen M, Nyren P. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science*. 1998;281(5375):363, 5. Epub 1998/08/15.
106. Quintanilla RH, Jr., Asprer JS, Vaz C, Tanavde V, Lakshmipathy U. CD44 is a negative cell surface marker for pluripotent stem cell identification during human fibroblast reprogramming. *PLoS One*. 2014;9(1):e85419. Epub 2014/01/15.
107. Yang AS, Estecio MR, Doshi K, Kondo Y, Tajara EH, Issa JP. A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(3):e38.
108. Bakshi A, Kim J. Retrotransposon-based profiling of mammalian epigenomes: DNA methylation of IAP LTRs in embryonic stem, somatic and cancer cells. *Genomics*. 2014;104(6 Pt B):538-44. Epub 2014/10/04.
109. Buecker C, Srinivasan R, Wu Z, Calo E, Acampora D, Faial T, et al. Reorganization of enhancer patterns in transition from naive to primed pluripotency. *Cell Stem Cell*. 2014;14(6):838-53.
110. Qin H, Hejna M, Liu Y, Percharde M, Wossidlo M, Blouin L, et al. YAP Induces Human Naive Pluripotency. *Cell Rep*. 2016;14(10):2301-12. Epub 2016/03/08.
111. Ho L, Tan SY, Wee S, Wu Y, Tan SJ, Ramakrishna NB, et al. ELABELA Is an Endogenous Growth Factor that Sustains hESC Self-Renewal via the PI3K/AKT Pathway. *Cell Stem Cell*. 2015;17(4):435-47.
112. Hayashi K, Ohta H, Kurimoto K, Aramaki S, Saitou M. Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell*. 2011;146(4):519-32.
113. Morgani S, Nichols J, Hadjantonakis AK. The many faces of Pluripotency: in vitro adaptations of a continuum of in vivo states. *BMC Dev Biol*. 2017;17(1):7.
114. Lujan E, Zunder ER, Ng YH, Goronzy IN, Nolan GP, Wernig M. Early reprogramming regulators identified by prospective isolation and mass cytometry. *Nature*. 2015;521(7552):352-6.
115. Murugan Ramalingam PV, Ugo Ripamonti, Wan-Ju Li. Futures Perspectives of Biomaterials and Stem Cell in Regenerative Medicine. Dans: Press C, rédacteur. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine: A Nano Approach*2012. p. 538.
116. Kim JS, Choi HW, Hong YJ, Do JT. Generation of Partially Reprogrammed Cells and Fully Reprogrammed iPS Cells by Plasmid Transfection. *Methods Mol Biol*. 2016;1357:85-95.
117. Kim JS, Choi HW, Choi S, Seo HG, Moon SH, Chung HM, et al. Conversion of partially reprogrammed cells to fully pluripotent stem cells is associated with further activation of stem cell maintenance- and gamete generation-related genes. *Stem Cells Dev*. 2014;23(21):2637-48.